



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE MEDICINA Y ENFERMERÍA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLÓGICAS

Área de Histología

Respuesta *in vivo* de las células satélites a extractos
musculares. Diferencias entre músculos lentos y rápidos

Eduardo Agüera Morales

Córdoba, 12 de junio de 2017

DIRECTORES: PROF. DR. JOSÉ PEÑA-AMARO Y PROF. DR. EVELIO LUQUE CARABOT

TITULO: *RESPUESTA IN VIVO DE LAS CELULAS SATÉLITES A EXTRACTOS MUSCULARES. DIFERENCIAS ENTRE MUSCULOS LENTOS Y RAPIDOS*

AUTOR: *Eduardo Agüera Morales*

© Edita: UCOPress. 2017
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



UNIVERSIDAD
DE
CÓRDOBA

Departamento de
Ciencias Morfológicas

**JOSÉ PEÑA AMARO, DOCTOR EN MEDICINA Y
CIRUGÍA Y CATEDRÁTICO DE HISTOLOGÍA DE LA
FACULTAD DE MEDICINA Y ENFERMERÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

INFORMA:

Que **D. EDUARDO AGÜERA MORALES**,
Licenciado en Medicina, ha realizado bajo mi
dirección en el Departamento de Ciencias
Morfológicas de la Universidad de Córdoba, el
trabajo titulado "**Respuesta *in vivo* de las células
satélites a extractos musculares. Diferencias
entre músculos lentos y rápidos**", ha sido
realizado bajo mi dirección y considero que reúne
los méritos suficientes para optar al grado de
Doctor en Medicina.

Y para que conste y surta los efectos
oportunos, firmo el presente informe en Córdoba a
quince de junio de dos mil diecisiete.



UNIVERSIDAD
DE
CÓRDOBA

Departamento de
Ciencias Morfológicas

**EVELIO LUQUE CARABOT, DOCTOR EN MEDICINA Y
CIRUGÍA Y PROFESOR TITULAR DE HISTOLOGÍA DE
LA FACULTAD DE MEDICINA Y ENFERMERÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

INFORMA:

Que **D. EDUARDO AGÜERA MORALES**,
Licenciado en Medicina, ha realizado bajo mi
dirección en el Departamento de Ciencias
Morfológicas de la Universidad de Córdoba, el
trabajo titulado "**Respuesta *in vivo* de las células
satélites a extractos musculares. Diferencias
entre músculos lentos y rápidos**", ha sido
realizado bajo mi dirección y considero que reúne
los méritos suficientes para optar al grado de
Doctor en Medicina.

Y para que conste y surta los efectos
oportunos, firmo el presente informe en Córdoba a
quince de junio de dos mil diecisiete.



TÍTULO DE LA TESIS: Respuesta *in vivo* de las células satélites a extractos musculares. Diferencias entre músculos lentos y rápidos.

DOCTORANDO/A: Eduardo Agüera Morales

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La presente tesis doctoral es resultado de la colaboración continuada del doctorando con los Grupos de Investigación PAIDI CTS-244 “Biopatología del Músculo Esquelético e Histomorfometría Humana” y CTS-985 “Regeneración Muscular” y su relación como Colaborador Honorario del Área de Histología entre los cursos académicos 1998-2008

La temática de la tesis doctoral aborda un área de gran interés, en relación con la Neurología especialidad médica que ejerce el doctorando, que trata de estimular la miogénesis para favorecer el crecimiento muscular en situaciones como atrofia o estimular la regeneración en músculos con déficit o pérdida de la misma. Evidentemente esto ofrece un gran interés para el campo de la neurología, rehabilitación, reumatología, así como en medicina y traumatología deportiva, en las que tiene un gran interés clínico desarrollar estrategias dirigidas a la recuperación de músculos lesionados o patológicos.

En nuestra opinión los resultados son potencialmente de interés clínico desde un punto de vista traslacional, ya que además de estimular el crecimiento y la miogénesis en músculo normal y atrofico, es relevante el hecho de que la administración sistémica lo posibilite en múltiples grupos musculares. Por otro lado, también es destacable el hecho de que las respuestas de hipertrofia y atrofia muscular estén condicionadas por el tipo de músculo del que se obtiene los extractos musculares ya que esto plantearía diferencias en el abordaje terapéutico de las diferentes condiciones patológicas de la musculatura esquelética (**artículos 1 y 2**). En este sentido, el establecimiento de claras diferencias entre músculos de distinta tipología en su respuesta a los extractos musculares ensayados nos planteó el empleo de ambos músculos en modelos experimentales de enfermedades neurodegenerativas (**artículos 3 y 4**).

En resumen, de la tesis doctoral se han derivado las siguientes aportaciones:

Artículos

1. E. Agüera, S. Castilla, E. Luque, I. Jimena, I. Ruz-Caracuel, F. Leiva-Cepa, J. Peña. *Muscular atrophy and hypertrophy in normal rats induced by administration of various muscle extracts* **Histology & Histopathology**, 31: 1367-1379. 2016
2. E. Agüera, S. Castilla, E. Luque, I. Jimena, F. Leiva-Cepas, I. Ruz-Caracuel, J. Peña. *Denervated muscle extract promotes recovery of muscle atrophy through activation of satellite cells. An experimental study* **Journal Sport and Health Sciences**, aceptado 28/3/2017

Un último artículo derivado de la línea de investigación abordada en la tesis doctoral será enviado en breve para su publicación:

Giovanetti-González R, Agüera E., Ruz-Caracuel I, Jimena I, Luque E. Martínez A, Peña J. *Muscle extracts lead to increased pericytes in normal soleus muscle of C57B/L6 transgenic mice* (en redacción) 2017.

Otros artículos relacionados con la temática y metodología de la tesis y desarrollados durante esta etapa:

3. E. Luque, I. Ruz-Caracuel, F.J. Medina, F. Leiva-Cepas, E. Agüera, F. Sánchez-López, R. Lillo, M. Aguilar-Luque, I. Jimena, I. Túnez, J. Peña. *Skeletal muscle findings in experimental autoimmune encephalomyelitis*. **Pathology Research and Practice**, 211: 493-504. 2015
4. E. Agüera, E. Luque, R. López-Martos, I. Jimena, I. Túnez, J. Peña. *Myotoxic effects of 3-nitropropionic acid on rat*. En revisión por la revista **Experimental Pathology and Toxicology**. 2017

Comunicaciones a Congresos

J. Peña, E. Luque, J.M. Recio, I. Jimena, E. Agüera, R. Vaamonde. *Hipertrofia de fibras musculares en ausencia de proliferación de células satélites*. XI Congreso Nacional de Histología La Rábida (Huelva), 2001

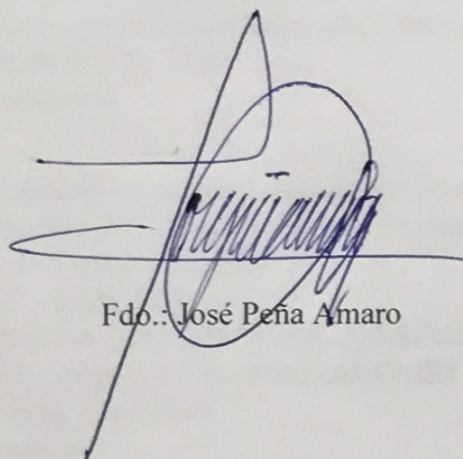
E. Luque, I. Jimena, E. Agüera, L. Jiménez Reina, F. Leiva-Cepas, J. Peña
Satellite cells and capillaries: topological relations in regenerating skeletal muscle
Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society (TERMIS) EU 2011
Annual Meeting
Granada, 2011

Leiva-Cepas F, Ruz-Caracuel I, E. Agüera, Jimena I, Luque E, Peña J
*Myogenic differentiation in skeletal muscle and interstitial mononuclear cells in the
absence of injury.*
VI Jornadas de Jóvenes Investigadores del IMIBIC. Córdoba, 2015

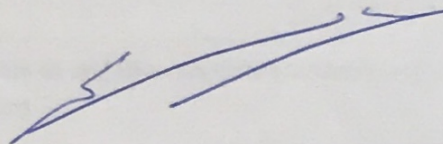
Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 31 de mayo de 2017

Firma de los directores

A complex, stylized handwritten signature in blue ink, featuring multiple loops and a dense, scribbled central area.

Fdo.: José Peña Amaro

A simple, fluid handwritten signature in blue ink, consisting of a few connected strokes.

Fdo.: Evelio Luque Carabot

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Dr. D. José Peña Amaro, Catedrático de Histología de la Facultad de Medicina y Enfermería de Córdoba, con toda mi admiración tanto personal como profesional. Este trabajo se culmina gracias a su esfuerzo, paciencia y gran disciplina investigadora, lo que acojo como enseñanzas que poder transmitir en resto de mi vida. Agradecer también a su mujer e hijas, por todo el tiempo que les privé de su compañía durante la realización de este trabajo.

Al Prof. Dr. D. Evelio Luque Carabot, su trabajo minucioso, y su rigor analítico han sido imprescindibles para llevar a cabo esta obra.

Al Prof. Dr. D. Ignacio María Jimena Medina, cuya actividad docente se inició simultáneamente a este trabajo y ha discurrido en paralelo al mismo, por sus aportaciones críticas y constructivas.

A D. Fernando Leiva Cepas, gracias a su dedicación y colaboración, ha sido posible que este y otros muchos trabajos, hayan logrado su objetivo.

A D. Ignacio Ruz Caracuel, colaborador desinteresado en este y otros proyectos, cuyas aportaciones han sido siempre inestimables.

Al Dr. Salvador Castilla Camacho, compañero desde la fase experimental, cuya amistad surgió con este trabajo y perdura en el día a día.

A Antonio J. Agüera, su minuciosidad y destreza han permitido que esta obra culmine con éxito.

Al Dr. D Fernando Sánchez López, profesor, guía, compañero y sobre todo amigo, que tanto veló por mi desarrollo personal y laboral, y cuyo interés por esta obra, ha sido la fuerza que la ha llevado a su fin. Hay una parte de él en cada página de esta obra.

Y por supuesto, a mis padres, por toda la entrega personal que han puesto en el desarrollo de mi vida, y a mis hermanas, dado que juntos, me aportaron la motivación necesaria para completar este proyecto, que tanto tiempo ha necesitado.

Introducción	1
Planteamiento general del tema.....	3
Hipótesis.....	9
Objetivos.....	9
Interés biomédico.....	10
 Antecedentes bibliográficos	 13
Histología de la célula miosatélite.....	15
La CMS y otros tipos celulares con potencialidad miogénica.....	29
La célula miosatélite en el músculo patológico.....	30
La CMS como elemento terapéutico en patología neuromuscular.....	39
 Material y métodos	 43
Animales y diseños experimentales.....	45
Extractos musculares.....	45
Primer experimento: ensayo de extractos musculares de distintos músculos en ratas normales.	46
Segundo experimento: ensayo de extractos de músculo sóleo en ratas con atrofia muscular.	47
Análisis en microscopía óptica.....	47
Técnicas histológicas, histoquímicas e inmunohistoquímicas	
Estudio histomorfométrico	
Análisis en microscopía electrónica de transmisión.....	51
Cortes semifinos y ultrafinos	
Estudio histomorfométrico	
Análisis estadístico.....	53

Resultados	55
Análisis de la respuesta de los músculos sóleo y EDL a los diferentes tipos de extractos.....	57
Efectos de los extractos derivados de músculos sóleo.....	57
Cambios histomorfométricos	
Efectos sobre la respuesta miogénica	
Efectos de los extractos derivados de músculos EDL.....	63
Cambios histomorfométricos	
Efectos sobre la respuesta miogénica	
Análisis de la activación de las células satélites por extracto de músculo denervado en la atrofia muscular por denervación.....	66
Evaluación de la respuesta miogénica en microscopía óptica	
Evaluación de la respuesta miogénica en microscopía electrónica	
Discusión	75
Hipertrofia y atrofia muscular en ratas normales provocada por la administración de diferentes extractos musculares.....	77
DmEx promueve la recuperación de la atrofia mediante la activación de las células satélites.....	83
Futuras líneas de trabajo.....	90
Conclusiones	93
Bibliografía	97
Criterios de calidad de los artículos publicados	127

Resumen

Fundamento. Incrementar el potencial miogénico en situaciones lesivas que afectan al músculo esquelético es de gran importancia clínica. Un buen modelo para estudiar el comportamiento de las células implicadas en los fenómenos proplásicos del músculo consiste en modificar el microambiente tisular *in vivo*, mediante la administración de extractos tisulares.

Objetivos. Los objetivos de este estudio se han dirigido, por un lado, a determinar el efecto de diferentes extractos musculares sobre dos tipos de músculo normales, rojo y blanco, y su población de células satélites; de otro, determinar si un extracto de músculo denervado (ExMd) podría estimular la respuesta de las células satélites en músculo denervado.

Material y métodos. Utilizamos ratas Wistar que fueron divididas en un grupo control y cuatro experimentales. Cada grupo experimental fue tratado intraperitonealmente durante 10 días consecutivos con un extracto diferente. Estos extractos se obtuvieron a partir de músculo sóleo normal, músculo sóleo denervado, músculo extensor digitorum longus normal y músculo extensor digitorum longus denervado. Se obtuvieron los músculos sóleo y EDL para su estudio en microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión; asimismo se analizaron parámetros morfométricos y se evaluó la respuesta miogénica. Para determinar si ExMd estimula a las células satélites en músculo denervado, ratas normales y denervadas fueron tratadas con ExMd. Los músculos sóleo fueron examinados empleando técnicas inmunohistoquímicas para antígeno de proliferación nuclear (PCNA), desmina y antígeno de diferenciación miogénica MyoD y el análisis cuantitativo y morfométrico de las células satélites en microscopía electrónica.

Resultados. Los resultados mostraron que el tratamiento con extractos de músculo sóleo normal y de músculo sóleo denervado provocaron hipertrofia y aumento de la actividad miogénica. Por el contrario, el tratamiento con extractos de músculos extensor digitorum longus normal y denervado tuvieron un efecto diferente dependiendo del músculo analizado. Así en el músculo sóleo se produjo hipertrofia de las fibras tipo I y aumento de la actividad miogénica, mientras que en el músculo extensor digitorum longus se observó atrofia de las fibras tipo II sin cambios en la actividad miogénica. Mientras la denervación provoca la activación de células satélites, DmEx también induce la diferenciación miogénica de células localizadas en el espacio intersticial y la formación de nuevas fibras musculares. Aunque DmEx tuvo un efecto similar sobre músculos inervados como denervados, se observaron diferencias cuantitativas que indican una mayor respuesta del músculo denervado a la acción de este tipo de extracto.

Conclusiones. Esto sugiere que la respuesta muscular de atrofia e hipertrofia puede depender de factores diferentes para cada tipo de músculo lo cuales pueden estar en relación con la innervación. Además, nuestro estudio muestra que el tratamiento de ratas denervadas con DmEx potencia la respuesta miogénica en los músculos denervados atroficos.

Abstract

Basis. Enhancement the myogenic potential in injurious situations affecting skeletal muscle is of great clinical interest. A good model to study the cells behavior involved in proplastic muscle phenomena is to modify the tissue microenvironment *in vivo*, through the administration of tissue extracts.

Objectives. The objectives of this study were, on the one hand, to determine the effect of different muscle extracts on two types of normal muscle, red and white, and its population of satellite cells; on the other hand, to determine whether a denervated muscle extract (DmEx) could stimulate satellite cell response in denervated muscle.

Material and methods. Wistar rats were used and were divided into a control group and four experimental groups. Each experimental group was treated intraperitoneally during 10 consecutive days with a different extract. These extracts were obtained from normal soleus muscle, denervated soleus, normal *extensor digitorum longus*, and denervated *extensor digitorum longus*. Following treatment, the soleus and *extensor digitorum longus* muscles were obtained for study under optic and transmission electron microscope; morphometric parameters and myogenic responses were also analyzed. To determine whether DmEx stimulates the satellite cells in denervated muscle, normal rats and denervated rats treated with DmEx. The soleus muscles were examined using immunohistochemical techniques for proliferating cell nuclear antigen (PCNA), desmin and myogenic differentiation antigen (MyoD), and electron microscopy for analysis of the satellite cells.

Results. The results demonstrated that the treatment with normal soleus muscle and denervated soleus muscle extracts provoked hypertrophy and increased myogenic activity. In contrast, treatment with extracts from the normal and denervated EDL had a different effect depending on the muscle analyzed. In the soleus muscle, it provoked hypertrophy of type I fibers and increased myogenic activity, while in the *extensor digitorum longus* atrophy of the type II fibers was observed without changes in myogenic activity. While denervation causes activation of satellite cells, DmEx also induces myogenic differentiation of cells localized in the interstitial space and the formation of new muscle fibers. Although DmEx had a similar effect, in nature, on innervated and denervated muscles, this response was of greater magnitude in denervated vs. intact muscles.

Conclusions. This suggests that the muscular responses of atrophy and hypertrophy may depend on different factors related to the muscle type which could be related to innervation. Further our study shows that treatment of denervated rats with DmEx potentiates the myogenic response in atrophic denervated muscles

Introducción	1
Planteamiento general del tema.....	3
Hipótesis.....	9
Objetivos.....	9
Interés biomédico.....	10

Planteamiento general del tema

La investigación en histología médica define sus objetivos en torno a los estados euplásticos, proplásticos y retroplásticos (Campos, 1985). Se trata de estados no lesionales existentes a nivel molecular, de orgánulos, células, tejidos y órganos, que permiten comprender el sustrato morfoestructural en el que asientan las lesiones, los mecanismos microscópicos que conducen tanto a la formación como a la defensa y reparación de las mismas y las posibilidades terapéuticas y efectos microscópicos de determinadas técnicas farmacológicas, físicas y quirúrgicas. En concreto, el estado proplástico es un estado de actividad general incrementada, constituido por los fenómenos de renovación, regeneración y reparación tendentes a la recuperación del estado de salud (Campos, 2004).

En el ámbito de la miología y miopatología, la investigación sobre las respuestas proplásticas centran un mayor interés puesto que son la base o fundamento para el diseño de estrategias terapéuticas (Peña y Jimena, 2008) que van desde la estimulación de la capacidad regenerativa de los músculos lesionados (Kasemkijwattana *et al*, 2000; Li *et al*, 2001; Lynch, 2001; Partridge, 2003a, 2003b ; Jimena *et al*, 2009; Turner y Badylak, 2012; McCullagh y Perlingeiro, 2015; Laumonier y Menetrey, 2016), terapias como la transferencia de mioblastos en enfermedades como las distrofias (Skuk, 2002; Morgan y Partridge, 2003; Negroni, 2006; Grounds y Davies, 2007; Shi y Garry, 2008) o en el diseño de músculos bioartificiales por ingeniería tisular (Okano y Matsuda, 1998; Grounds, 2000; Wright *et al*, 2001; Machingal *et al*, 2011; Corona *et al*, 2013; Xu *et al*, 2015; Passipieri y Christ, 2016).

La base estructural de la capacidad proplástica del músculo esquelético adulto se encuentra en la existencia de una población de células madre miogénicas denominadas células miosatélites (CMSS) implicadas en los procesos de crecimiento postnatal, hipertrofia y regeneración (Bischoff, 1994; Adams, 1998; Anderson *et al*, 1998; Allen *et al*, 1999, Blaveri *et al*, 1999; Da Silva y Peña, 2004; White *et al*, 2010; Murphy *et al*, 2011; Wang y Rudnicki, 2011; Yin *et al*, 2013; Blaauw y Reggiani, 2014; Chang y Rudnicki, 2014; Kim y Braun, 2014). Estas células, que reciben su nombre de la característica ubicación que tienen entre la membrana plasmática y la lámina basal de la fibra muscular, y que en el músculo esquelético adulto normal se encuentran en una situación de reposo, parecen no constituir una población homogénea ni entre músculos de distinta tipología histoquímica ni dentro de un mismo músculo, lo cual debe

ser tenido en consideración en el diseño de estrategias terapéuticas (McLennan, 1994; Bornemann *et al*, 1999; Biressi y Randon, 2010; Almeida *et al*, 2016). Las evidencias de esta heterogeneidad se refieren no solamente por un lado a la existencia de subpoblaciones con diferentes propiedades biológicas, bioquímicas, morfológicas y funcionales y de otro a las características histofisiológicas de los músculos en los que se encuentran, sino también a la propia población general de células satélites (Dumont *et al*, 2015; Randolph y Pavlath, 2015).

Si consideramos la tipología histoquímica de los músculos esqueléticos, se confirman diferencias en la población de CMSS. En este caso, es conocido que estas células son más numerosas en músculos oxidativos, como el sóleo, frente a músculos con mayor porcentaje de fibras blancas como el músculo extensor digital largo (EDL) (Gibson y Schultz, 1982). Por tanto, se asume que, en general hay más células satélites por volumen (“densidad de células satélites”) y por núcleos de fibra (“frecuencia de células satélites”) en los músculos oxidativos (fibras tipo 1 y 2B) que en los músculos glicolíticos (fibras tipo 2B) (Heimann *et al*, 1996). Es posible que estas diferencias en el número se expliquen por el hecho de que las CMSS sean reclutadas para fusionarse con la miofibra a la que se asocian por el mayor recambio mionuclear inherente a los músculos lentos frente a los rápidos tras la lesión neuromuscular (Schmalbruch y Lewis, 2000)

Estudios *in vitro* han puesto de manifiesto diferencias entre CMSS basándose en su grado proliferativo (Schultz y Lipton 1982; Molnar *et al*. 1996; Schultz 1996; Lagord *et al*. 1998), en su capacidad para la fusión (Baroffio *et al*. 1996) y en su capacidad para migrar o responder a factores de crecimiento (Cossu y Molinaro 1987; McFarland *et al*. 1993, 1995; Watt *et al*. 1994). También la diferente potencialidad miogénica que presentan en cultivo las células satélites derivadas de músculo sóleo y músculo EDL confirman esta heterogeneidad (Lagord *et al*, 1998). Las investigaciones de Feldman y Stockdale (1991) muestran que células satélites obtenidas de músculo rojo (latísimo dorsal anterior) y músculo blanco (pectoral mayor) originan en cultivo fibras musculares del mismo tipo que sus músculos originarios.

Los datos sobre diferencias morfológicas en la población de CMS son escasas, aunque se han demostrado diferencias cuantitativas en sus componentes citológicos comparando morfométricamente las CMSS de ambos músculos (Baranska *et al*, 1997) y su aspecto ultraestructural dentro de un mismo músculo durante el crecimiento de las fibras musculares regenerativas (Luque *et al*, 1996). Jouvion *et al*. (2006) han observado que se pueden

discriminar *in vitro*, con criterios ultraestructurales y morfométricos, dos subpoblaciones de mioblastos derivados de CMS dentro de un mismo músculo indicativo de su respectiva progresión hacia la diferenciación miogénica. Más recientemente mediante análisis clonal, que permiten analizar los procesos de división celular, se confirman las características celulares y moleculares de la heterogeneidad funcional entre las CMSS (Kitajima *et al*, 2016).

Otra demostración de la existencia de la heterogeneidad de la población de CMSS se refiere a su diferente respuesta a estímulos ambientales. Se han identificado subpoblaciones de CMS sobre la base de su distinta sensibilidad a los factores de crecimiento implicados en la proliferación (Yablonka-Reuveni y Rivera 1994; McFarland *et al*. 1995) o a la irradiación (Heslop *et al*. 2000). Además, la capacidad proliferativa de las CMSS al factor de crecimiento hepatocitario (HGF) difiere en función del músculo (rojo o blanco) del que se han obtenido (Zeng *et al*. 2002).

Independientemente de que las poblaciones de CMSS de los músculos rojos y blancos sean diferentes, se debe considerar también la posibilidad de que las diferencias en la respuesta a determinadas situaciones tanto patológicas como fisiológicas de músculos de diferente tipología histoquímica (y por tanto histofisiológica) pueda también estar ligada a las características específicas de cada músculo. Es bien conocida la distinta susceptibilidad de los músculos a diferentes tipos miopatías inducidas experimentalmente por el ejercicio exhaustivo (Salminen y Vihko, 1983; Peña *et al*, 1987), por administración de heroína pura (Peña *et al*, 1990), tras la denervación (Bakou *et al*, 1996), a la inmovilización (Józsa *et al*, 1990). También en ratones *mdx* la enfermedad varía marcadamente entre los distintos músculos; mientras que el músculo diafragma se encuentra afectado por una masiva necrosis, los músculos de los miembros se afectan moderadamente (Stedman *et al*, 1991). Estas diferencias se atribuyen a las características específicas de cada tipo histoquímico de fibra (Wang y Kernell, 2001). Por lo que respecta a las respuestas proplásicas se ha comprobado que los músculos EDL y sóleo presentan diferencias en su respuesta regenerativa (Bassaglia y Gautron, 1995; Mendler *et al*, 1998; Zimowska *et al*, 2017), o que un músculo lento como el *anterior latissimus dorsi* de las aves muestre una mayor respuesta hiperplástica y de crecimiento que el músculo blanco *posterior latissimus dorsi* (Kennedy *et al*, 1988; 1989)

Por otro lado, dos de los factores reguladores de la miogénesis, MyoD y miogenina, implicados en la respuesta proplásica de la CMS en el músculo esquelético adulto, se expresan

en proporciones específicas en los músculos rápidos y lentos en rata adulta: MyoD se expresa en mayor proporción en los músculos blancos y la miogenina en los músculos rojos (Hughes *et al*, 1993; Voytik *et al*, 1993; Hughes *et al*, 1993; Hughes *et al*, 1997) y cada músculo responde diferentemente a la denervación con respecto a los incrementos en la expresión de estos factores reguladores (Walters *et al*, 2000).

Por tanto, si realmente existen poblaciones de CMSS con distinto potencial proliferativo-diferenciativo, diferencias en el contenido de organelas en las células satélites de músculo blancos y rojos, diferencias en la densidad poblacional y diferencias en el potencial miogénico *in vitro*, esto implicaría que los distintos músculos tendrían si no una respuesta diferente en los procesos en los que está implicada la CMS, sí justificaría variaciones cualitativas y cuantitativas en esa respuesta. Sin embargo, también debería ser considerada la posibilidad de que el comportamiento o respuesta de las células madre biogénicas estuviese condicionada por el entorno tisular específico en el que se asientan.

Si bien las CMSS son mitóticamente quiescentes en músculo adulto, su activación, proliferación y diferenciación pueden ser iniciadas en respuesta a factores extrínsecos durante los procesos de crecimiento y regeneración (Adams, 1998; Allen *et al*, 1999). Estos factores extrínsecos constituyen un poderoso determinante del comportamiento celular al condicionar o modificar el “microambiente tisular” (factores solubles y matriz extracelular), lo que lleva a plantearse que el microambiente de los diferentes músculos podría influir en la cinética particular de los procesos que afectan al músculo, en concreto a la respuesta de la CMS, y por tanto a la capacidad proplásica del músculo esquelético (Jejurikar y Kuzon, 2003; Bani *et al*, 2008).

Se ha sugerido que cambios en el microambiente tisular pueden ser requeridos para la migración, proliferación y diferenciación de las células madre en los procesos regenerativos (Totter *et al*, 2011). Recientes estudios ponen de manifiesto la importancia del microambiente tisular en los procesos proplásicos del músculo esquelético; así, se han demostrado la importancia del microambiente en la regulación de la diferenciación en tipos de fibras musculares cuando las células satélites se diferencian hacia mioblastos durante la regeneración de la fibra muscular (Matsuoka e Inoue, 2008) o en su influencia en el patrón cinético de la inflamación y regeneración de las miofibras por la actividad de las metaloproteasas en diferentes etapas evolutivas de la miopatía en ratones distróficos *mdx* (Bani *et al*, 2008).

También los aspectos ligados al “microambiente” son claves para maximizar la incorporación de las células implantadas en terapia celular (White y Grounds, 2003). En esta misma línea es interesante señalar que, aunque el declive del potencial regenerativo de los tejidos es una característica del envejecimiento que parece estar ligado a cambios que afectan a la población de células madre, la influencia de factores sistémicos sobre ellas juegan un papel muy importante al modular su respuesta proliferativa (Conboy *et al*, 2005; Verdijk, 2014).

Por tanto, modificar el microambiente tisular *in vivo* en un órgano normal o no, puede ser un buen modelo para estudiar el comportamiento de las células implicadas. Una manera de actuar sobre ese microambiente sería administrar factores de crecimiento que actuaran sobre el proceso regenerativo del músculo esquelético adulto (Li *et al*, 2000; Lynch, 2001; Vitello *et al*, 2004; Lynch *et al*, 2007). Sin embargo, estos factores de crecimiento son meros mensajeros [tanto por su concentración, momento de liberación, punto del ciclo celular en que actúan y célula receptora (Creaney, 2011)] y no un programa regenerativo completo, por lo que su administración individualizada puede forzar respuestas que no ocurren de forma espontánea en un proceso proplásico. Aunque la información derivada del empleo de estos factores de crecimiento es fundamental para determinar el papel que desempeñan, pueden enmascarar la identificación y papel que juegan otros precursores de células musculares diferentes a la CMS.

Por el contrario pensamos que el empleo de extractos musculares permitiría recrear con mayor fidelidad el microambiente tisular en una situación biológica determinada ya que no contendrían un único factor, sino que representarían un “completo complejo proteico” (Echeverri y Tanaka, 2002); es decir, en principio, los diferentes factores de crecimiento implicados deberían encontrarse en los niveles adecuados que se establecen en la respuesta tisular a una determinada situación biológica o patológica (Peña, 1987). En este sentido, existe evidencia experimental *in vitro* e *in vivo* de los efectos de diferentes extractos musculares sobre las fibras musculares, células satélites y mioblastos. Extractos de músculo lesionado han sido capaces de estimular la regeneración postlesión *in vivo* o *in vitro* (Summers *et al*, 1985; Bischoff, 1986; Cheng y Quinn, 1992; Bischoff y Heintz, 1994; Haugk *et al*, 1995; Haugk *et al*, 1996; Bischoff, 1997; Cheng *et al*, 2005) y extractos obtenidos a partir de músculo denervado han provocado una respuesta de hipertrofia en músculo esquelético normal de rata en la que se encuentra implicada la CMS (Jimena *et al*, 1993; Peña *et al*, 1995; Jimena *et al*, 1998) y promueven el crecimiento de las neuritas *in vitro* (Nishimune *et al*, 1998). Por otro lado, extractos no purificados de tejido muscular son capaces de mantener vivas a las motoneuronas tanto *in vitro* como *in vivo* (Bloch-Gallego *et al*, 1991; Houenou *et al*, 1991) y cuando es

obtenido de músculo denervado la actividad trófica sobre las motoneuronas se ve incrementada (Henderson *et al*, 1983; Comella *et al*, 1994).

El efecto potenciador de extractos obtenidos a partir de músculo denervado podría tener como base el hecho de que uno de los factores que controlan la actividad de las CMS sea la innervación (Bischoff, 1990; Bischoff and Franzini-Armstrong, 2004; Bornemann *et al*, 1999), por lo que las modificaciones que ocurren en el microambiente tisular en esta situación del músculo esquelético podrían influir en el comportamiento de la población de CMSS. Tras la denervación del músculo esquelético adulto se inicia una reactivación de la miogénesis (Borisov *et al*, 2001) en la que ocurre un aumento en el contenido de RNAm y de proteína MyoD además del incremento del número de núcleos positivos para MyoD en el músculo esquelético (Legerlotz y Smith, 2008). Sin embargo, no se conoce si la denervación afecta a la actividad de las células satélite directamente o a través de factores liberados por las fibras musculares (Ehrhardt and Morgan, 2005). Schmalbruch y Lewis (2000) sugieren que, aunque la actividad mitótica de las células satélite puede estar gobernada por las propiedades y actividades eléctricas de la membrana de la fibra muscular, algún factor difusible tiene que estar implicado, ya que de otro modo no justificaría el cambio paralelo (que es cuantitativamente similar) que sufren los núcleos en el tejido conectivo. Tales factores, liberados cuando el músculo es denervado, pueden jugar un papel en la activación de las células satélite en la respuesta regenerativa que se establece (Bakou *et al*, 1996; Yoshimura y Harii, 1999) o explicar que un déficit de los mismos conduciría a una escasa disponibilidad de células satélite (Schmalbruch, 1990; Jejurikar y Kuzon, 2003) o a su incapacidad para fusionarse con las fibras musculares contribuyendo así a una regeneración abortiva en la postdenervación (Viguie *et al*, 1997; Borisov *et al*, 2005).

Considerando lo anteriormente expuesto, parece evidente que:

1. El microambiente tisular que se establece inmediatamente tras la denervación es rico en señales que parecen activar a la población de CMSS, lo que hace que la utilización de un extracto de músculo denervado sea un modelo válido para analizar el comportamiento de este tipo celular.
2. El microambiente tisular generado tras la denervación en músculos rojos y blancos puede ser diferente y, por tanto, sus efectos podrían no ser similares.

3. Dada la heterogeneidad en la distribución de tipos de fibras en los m-SOL y m-EDL, se ha sugerido la posibilidad de que existan diferencias entre las células satélites mostrando diferentes requerimientos o sensibilidades a los factores que influyen en su comportamiento (Schultz, 1989; Yun *et al*, 1997). De hecho, se ha sugerido que podrían existir diferencias inherentes en los tipos de músculos con respecto a su capacidad para formar nuevas fibras (White y Esser, 1989).

Por tanto ¿es posible que estos extractos podrían ser diferentes en función del tipo de músculo y que hubiese diferencias en la respuesta de las CMSS? En base a ello, planteamos la siguiente

Hipótesis

“Extractos obtenidos tras la denervación de dos tipos de músculos de tipología diferente (rojo y blanco) podrían no tener el mismo efecto sobre las fibras musculares esqueléticas y la población de CMSS”

Objetivos

Basándonos en las diferencias que han sido referidas entre las poblaciones de células satélites de los músculos sóleo y EDL, queremos comprobar si extractos musculares obtenidos de ambos músculos en situación de denervación pueden:

1. Provocar una respuesta diferente en las fibras musculares y población de CMSS de un músculo rojo (SOL) y un músculo blanco (EDL) y si la respuesta está determinada por el tipo de músculo del cual se obtiene el extracto (sóleo o EDL).
2. Basándonos en que la activación de las CMSSon la base para la estimulación de las respuestas proplásicas en el músculo esquelético la potenciación, mediante la administración de extractos, podría activar a las CMSpara mejorar la recuperación de la atrofia muscular por denervación.

Interés biomédico de la investigación propuesta

Nuestro estudio plantea la posibilidad de que los músculos rojos y blancos posean diferente potencial miogénico al modificar su “microambiente tisular” inducido por la administración de extractos obtenidos en una situación de denervación. Dado que existen muy pocos experimentos diseñados para inducir cambios en la población de CMSS *in vivo* sin lesionar físicamente al músculo (Barjot *et al*, 1998), pensamos que nuestro modelo experimental podría resultar muy útil para comprobar su comportamiento al modificar el microambiente tisular sin alterar la estructura histológica del músculo esquelético.

Uno de los grandes retos clínicos en el campo de la Neurología es encontrar terapias eficaces frente a las diferentes enfermedades neuromusculares. En esta línea, la investigación en medicina regenerativa del músculo esquelético adquiere una fundamental importancia en el diseño de estrategias terapéuticas que detengan los procesos degenerativos, estimulen el crecimiento de los músculos atroficos y favorezcan la regeneración muscular.

En el centro de interés de esta área de investigación se encuentra la CMS y en concreto las señales inductoras que modulan su comportamiento (Cossu y Mavilio, 2000; Skuk *et al*, 2002; Partridge, 2003a, 2003b; White y Grounds, 2003; Sorrentino, 2004; Wozniak *et al*, 2005; Sherwood y Wagers, 2006; Price *et al*, 2007; Kuang y Rudnicki, 2008; Yablonka-Reuveni, 2011; Fu *et al*, 2015; Xing *et al*, 2015). Es necesario dilucidar estas señales responsables de la activación de estas células, especialmente en situaciones donde pueden desarrollar su papel mediando en los efectos beneficiosos sobre la recuperación de músculos lesionados, en miopatías determinadas genéticamente en las que alteraciones de las funciones básicas de las CMSS dificultan o impiden progresivamente el mantenimiento de la masa muscular y/o en la regeneración dando lugar a una atrofia progresiva de la musculatura esquelética (Brooks y Myburgh, 2014; Kinney *et al*, 2017).

Sin embargo, el problema en algunas situaciones patológicas puede no ser ni una alteración estructural ni la menor dotación de CMSS, sino una disfunción biológica relacionada con su “entorno ambiental”. Este es el caso que parece ocurrir en la sarcopenia; para

Shavlakadze *et al* (2009) no está justificada la propuesta de tratarla con terapia celular, ya que los músculos de animales seniles tienen una dotación intrínseca de células miogénicas suficientes y capaces de una repuesta adecuada, aunque sí son críticos factores locales y ambientales en la sarcopenia. Otros estudios recientes también han mostrado que defectos en las funciones básicas de las CMSS en varias patologías podrían estar implicados en la fisiopatología de las mismas. Por ejemplo, CMSS derivadas de músculos de pacientes afectos de Distrofia Miotónica tipo 1 (Thornell *et al*, 2009) y en la Esclerosis Lateral Amiotrófica (Padrat *et al*, 2011) parecen incapaces de proliferar *in vitro* por lo que jugarían un papel en la fisiopatología de la progresiva atrofia y debilidad muscular observada en estos enfermos. Recientemente se ha demostrado que la población de CMSse encuentra reducida en las contracturas musculares de los pacientes con parálisis cerebral (Smith *et al*, 2013; Dayanidhi *et al*, 2015).

Por todo ello es posible que algunas de la vías de señalización puedan estar relacionadas o ser responsables de una ineficaz respuesta proplásica del tejido muscular, por lo que la identificación de factores sistémicos y locales que regulan a la CMS podría, además de mejorar nuestra comprensión de su implicación en las respuestas de hipertrofia, hiperplasia y regeneración, entender los mecanismos que intervienen en la pérdida de la capacidad regenerativa y de crecimiento de los músculos patológicos al mismo tiempo que ayudaría al desarrollo de terapias dirigidas al incrementar su potencial proplásico (Wagers y Conboy, 2005; Usas y Huard, 2007).

Antecedentes bibliográficos	13
Histología de la célula miosatélite.....	15
La CMS y otros tipos celulares con potencialidad miogénica.....	29
La célula miosatélite en el músculo patológico.....	30
La CMS como elemento terapéutico en patología neuromuscular.....	39

Histología de la célula miosatélite

En el pasado año 2011 se han cumplido 50 años desde el descubrimiento de la CMS por parte de Alexander Mauro y Bernard Katz quienes realizaron, de manera independiente en músculos de rana y rata respectivamente, las primeras descripciones en microscopía electrónica (Yablonka-Reuveni, 2011). Desde ese momento hasta la actualidad la CMS ha sido y es foco de atención de muchos grupos de investigación, que han contribuido a su conocimiento, tanto en sus aspectos biológicos como patológicos y, más recientemente, por su potencial utilidad en el diseño de terapias para hacer frente a las enfermedades neuromusculares.

En este apartado de la tesis doctoral presentamos una visión general sobre este tipo celular, pero remitimos a los interesados a consultar las excelentes revisiones que se incluyen en el capítulo de referencias bibliográficas.

Concepto

Las CMSS son células precursoras miogénicas residentes en el músculo esquelético adulto. Vienen definidas por la posición que ocupa con respecto a la fibra muscular: se localizan en depresiones de la superficie de ésta quedando dispuestas entre la membrana plasmática y la lámina basal. Cuando la CMS abandona este compartimento o pierde sus relaciones topográficas como consecuencia de la lesión de la fibra muscular, debe denominarse mioblasto; es decir, una célula precursora local capaz de sufrir la diferenciación miogénica terminal y que engloba, además de los mioblastos adultos (o CMS) a los mioblastos fetales y embrionarios (Mourkioti y Rosenthal, 2005).

Origen

El origen embriológico de las CMSS sigue siendo materia de debate. Estas células son detectadas en posición sublamina en el período final de la embriogénesis (Feldman y Stockdale, 1992). Aunque está generalmente aceptado que las CMSS son de origen somítico, recientes evidencias apuntan al hecho de que algunas pueden derivar de células endoteliales primordiales que entran en el músculo por vía de la circulación o como células perivasculares asociadas con los vasos en desarrollo antes de que queden comprometidas hacia la línea miogénica como consecuencia de la influencia microambiental (Bianco y Cossu, 1999; De Angelis *et al*, 1999) (Fig.1). En cualquier caso, el origen somítico o no somítico de las CMSS no es necesariamente mutuamente excluyente. Incluso, es razonable pensar que ambos orígenes

puedan contribuir, tanto en situaciones fisiológicas como patológicas al establecimiento de la población celular (Hawke y Garry, 2001).

□

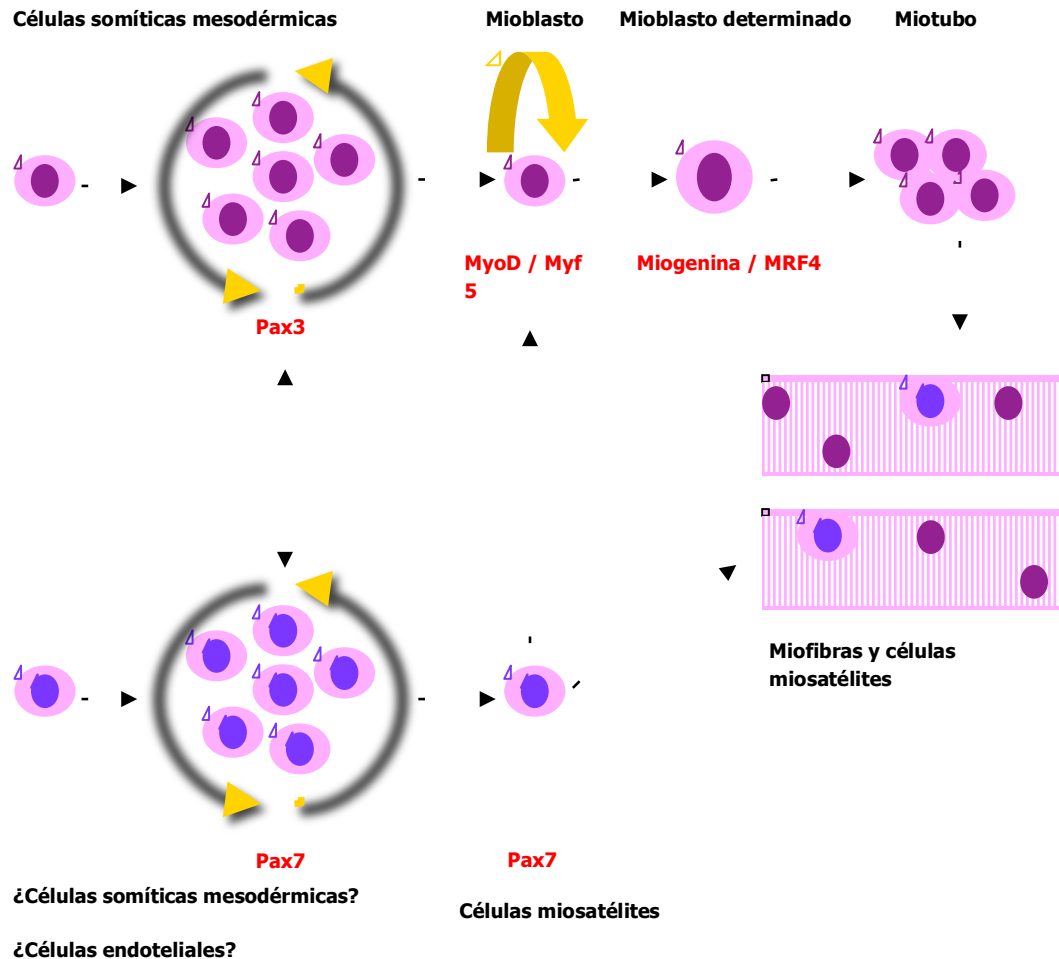


Figura 1. Esquema que representa el posible origen de las CMSS (modificado de Chargé y Rudnicki, 2004)

Existen una serie de genes que se encargan de regular el mantenimiento de las células madre y su progresión y diferenciación hacia la línea miogénica; algunos de ellos se reexpresan durante el crecimiento postnatal y la regeneración del músculo esquelético adulto. Los genes Pax3 y Pax7 desempeñan un papel muy importante en el inicio y mantenimiento de la miogénesis embrionaria. Sin embargo, Pax3 no parece jugar un papel importante en los progenitores musculares, mientras que se ha comprobado que la deficiencia de Pax7 provoca la ausencia de CMSS en el músculo (Kuang et al, 2006). Por lo que respecta a los genes reguladores de la miogénesis, como Myf-5, Mrf4 y MyoD se encargan de la determinación miogénica de los progenitores embrionarios, mientras que miogenina pone en marcha la diferenciación muscular.

Morfología

Las descripciones de la célula satélite en el músculo esquelético humano normal son en general coincidentes con las de otros mamíferos. Se trata de una célula mononucleada con forma ahusada y, dado que generalmente está orientada en paralelo con la fibra muscular, en cortes longitudinales se muestra alargada mientras que en secciones transversales presenta un perfil redondeado. Las dimensiones de las CMSS en los músculos de mamíferos son aproximadamente de 25x4x5 µm (Campion, 1984).

Sus rasgos citológicos se corresponden con los de una célula indiferenciada, de una célula en reposo o quiescencia. Posee una elevada relación núcleo/citoplasma derivada del poco citoplasma que posee. Su núcleo, de morfología oval, es muy heterocromático en comparación con los mionúcleos lo que sugiere que es transcripcionalmente menos activo siendo más pequeño que estos (Watkins y Cullen, 1988). El citoplasma es muy escaso y contiene muy pocas organelas, a excepción de un notable número de caveolas que son más numerosas en la cara de la célula satélite que se relaciona con la lámina basal de la fibra muscular (Laule y Bornemann, 2001). Las mitocondrias de las células satélites son más pálidas y tienen menos crestas que las de la fibra muscular a las que se asocian (Reger y Craig, 1968; Roth *et al*, 2000). Ocasionalmente se han descrito granos de lipofucsina en el citoplasma de la célula satélite (Wokke *et al*, 1989) especialmente en sujetos de mayor edad (Roth *et al*, 2000); esto puede alterar el comportamiento de la célula satélite al retrasar su activación como ha sido observado en cultivos (Renault 2002).

Lo reseñado en el párrafo anterior es válido para las CMSS de toda la musculatura esquelética a excepción de los músculos craneofaciales. En concreto, se ha demostrado que los músculos extraoculares y laríngeos retienen de manera permanente una población de CMS activadas necesaria para proveer la continua adición de mionúcleos para la remodelación continua en la vida diaria (McLoon *et al*, 2007)

Localización, distribución y relaciones topográficas

Como se ha referido con anterioridad la CMS ocupa una depresión en la superficie de la membrana plasmática o sarcolema y quedando envuelta por la lámina basal de la fibra muscular (fig. 2). Se encuentra separada de la fibra muscular a la que se asocia, por un espacio de 15-20 µm de espesor y que no contiene elementos de lámina basal (Campion, 1984). Sin embargo, este espacio parece estar especializado ya que en él se ha comprobado la existencia de inmunoreactividad para M-caderina (Bornemann y Scmalbruch, 1994).

Hoy se considera que esta ubicación compartimentalizada sirve como un “nicho o ambiente instructivo”, en el cual la CMS se mantiene, en condiciones de normalidad o euplasia, en un estado de reposo o quiescencia o, bajo ciertos estímulos, pueden ser activadas para proliferar y diferenciarse para actuar como células madre miogénicas. Recientemente se ha introducido el concepto de “nicho” o “zona de célula madre” referido a la localización histológica en la cual una célula madre se mantiene en una situación de quiescencia, antes de dividirse y generar poblaciones celulares que proliferan y se diferencian hacia otros tipos celulares y las interacciones dinámicas y permanentes (es decir, el ambiente instructivo) entre la célula madre y su microambiente. La comprensión de estos nichos es fundamental, además de para conocer la situación de quiescencia que mantiene en el músculo normal, en la identificación de los factores de crecimiento (y otros) que los regulan, constituyentes de la matriz y las condiciones fisiológicas en las que incrementarían la regeneración tisular (Mounier *et al*, 2011).

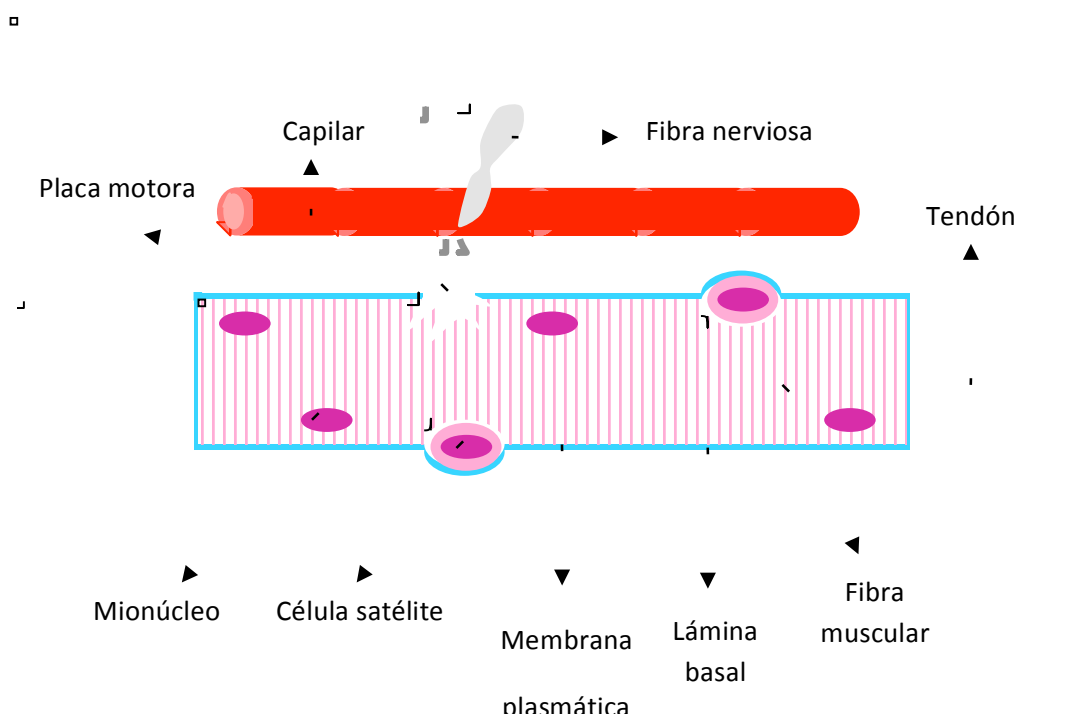


Figura 2. Esquema general de una fibra muscular y sus relaciones con las células satélite, vascularización, innervación y tendón. (Tomado con autorización de Jimena y Peña, 2008).

Distribución y relaciones topográficas

1.- Complejo miofibra-célula satélite

Es importante saber que existe una íntima relación entre células satélite y fibras musculares; por esta razón hablamos de complejo miofibra-célula satélite. Cada fibra muscular

esquelética posee una dotación propia de CMSS que se distribuye a lo largo de toda la longitud de la fibra (Cardasis y Cooper, 1975); esto es evidente por el hecho de que dicha dotación se encuentra englobada por la propia lámina basal de cada fibra muscular. Las CMSS se encuentran asociadas a las fibras musculares extrahusales y, también a las intrahusales (Soukop y Thornell, 1999).

La relación de la CMS con la lámina basal y la membrana plasmática de la fibra muscular sugiere que ambas deben influir sobre su situación funcional; de hecho, es crucial para el mantenimiento de su quiescencia (Dhawan y Rando, 2005). En este sentido Bischoff (1990a) ha comprobado en cultivos que el plasmalema ejerce una “inhibición por contacto” sobre la CMS en fibras musculares viables, mientras que se activan en fibras donde la membrana estaba lesionada; sin embargo, parece que esta inhibición no es absoluta ya que puede superarse cuando se aumenta la concentración *in vitro* de extractos de músculo lesionado.

También se ha sugerido que la fibra muscular a la que se asocia la CMS puede actuar como una fuente paracrina de factores o agentes reguladores sobre ella (Yablonka-Reuveni *et al*, 1999). Sin embargo, las CMSS no parecen estar programadas para originar un determinado tipo de fibra (Pette *et al*, 2002)

2.- Las CS son más numerosas a nivel de determinados territorios a lo largo de la fibra muscular: la placa motora y la unión miotendinosa.

Si bien las células satélites se distribuyen a lo largo de la longitud de la fibra muscular, de manera aislada es decir sin contactar entre ellas, lo que sugiere que su función se desarrolla a lo largo de toda la fibra. Sin embargo, se encuentran en mayor número en la vecindad de la región de placa motora (Kelly, 1978; Wokke *et al*, 1989), posiblemente en relación con procesos de remodelación, reparación o regeneración de éste área o en el suministro de nuevos mionúcleos en la misma (Holterman y Rudnicki, 2005).

Existen también evidencias de que son más numerosas, tanto en músculo fetal como en músculo de recién nacido, en los extremos de la fibra, lo que ha sido relacionado por la necesidad de crecimiento en longitud de la misma (Campion, 1984; Allouh *et al*, 2008). No se puede excluir el hecho de que su mayor número a nivel de la unión miotendinosa pueda ser consecuencia de mayores requerimientos remodelativos y o reparativos ya que esta región es una de las áreas que sufre mayor número de lesiones (Knudsen *et al*, 2015)

3.- Las CMSS se disponen próximas a capilares (fig. 3). Su íntima vecindad a capilares ha sido un hecho que ha llamado la atención por algún autor (Schmalbruch y Hellhammer, 1976; 1977) y, aunque no se ha ofrecido una explicación al respecto, parece claro que esta disposición no es al azar. Yablonka-Reuveni *et al* (1999) ha señalado que, en músculo esternocleidomastoideo de

rata, el 63% de las CMS observadas estaban muy próximas a un capilar; dado que un capilar cubre mucho menos de la mitad de la circunferencia de la fibra muscular, esta disposición no puede ser casual. Recientes investigaciones sugieren una íntima relación entre células ligadas a la línea vascular con los mecanismos de renovación y origen de al menos parte de la población de células satélites (Holterman y Rudnicki, 2005; Christov et al, 2007).

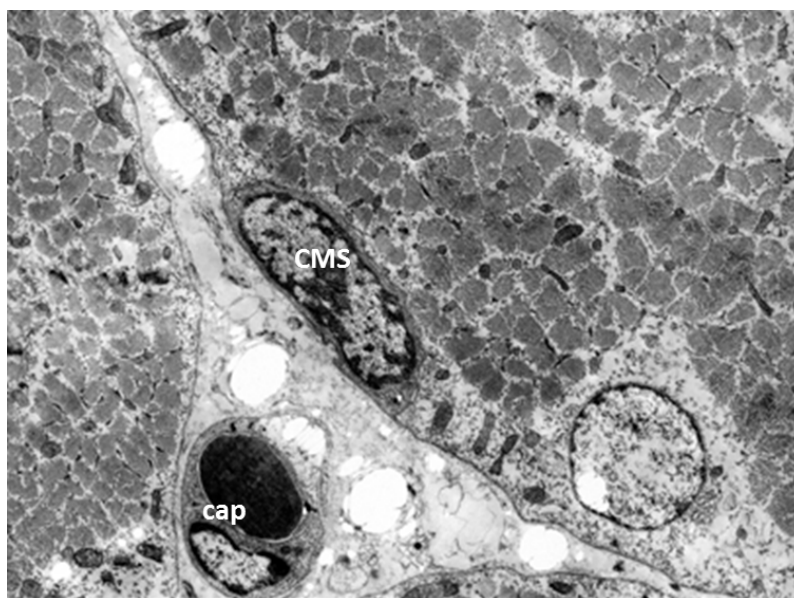


Figura 3. Micrografía electrónica en la que se observa una CMS quiescente, ubicada en su posición normal entre la membrana plasmática y la lámina basal. Obsérvese la proximidad del capilar localizado en el endomisio (Archivo fotográfico del Grupo de Investigación REGMUS. Área de Histología. Facultad de Medicina y Enfermería. UCO).

El número de CMSS está positivamente relacionado con la capilarización de las miofibras (Christov *et al*, 2007; Mounier *et al*, 2011). Existe, por tanto, una estrecha relación entre la CMS, los capilares y las células asociadas a estos; dicho de otro modo, el nicho que ocupa una célula sirve como ambiente instructivo en el control de la situación de quiescencia /activación de la célula satélite y para diseñar estrategias para fomentar la regeneración tisular, así como el mantenimiento y la reparación de las fibras musculares (Bentzinger *et al*, 2013). Es interesante señalar que, aunque tras la lesión se pierde la relación entre los elementos de este nicho, al finalizar la regeneración se reestablecen estas relaciones (Ruz-Caracuel *et al*, 2013)

Número

El número de CMSS parece estar influenciado por la especie animal, edad y tipo de fibra. Aproximadamente representan el 2-7% de todos los núcleos de una fibra muscular, pero difiere según el tipo de músculo, o más específicamente en función del tipo de fibra a la que se asocia.

En el momento del nacimiento el 20-30% de los núcleos sublaminares en músculo esquelético de ratón corresponden a CMSS, declinando hasta el 5% conforme el animal crece hasta los dos meses de edad y continúa disminuyendo hasta el 2% en ratones seniles (Chargé y Rudnicki, 2004). En la rata sana o normal, las células satélites constituyen el 3% del total de núcleos de la fibra muscular en un músculo blanco mientras que en un músculo rojo este porcentaje es del 4-6%(Gibson y Schultz, 1982). Es decir, las CMSS son más numerosas en músculos oxidativos como el sóleo frente a músculos con mayor porcentaje de fibras blancas como el músculo extensor digital largo. Sin embargo, según los resultados obtenidos por LaFramboise *et al* (2003) las CMSS derivadas de músculo adulto forman *in vitro* una población celular homogénea independiente del tipo de fibra, localización anatómica del músculo y origen embrionario del mismo. No deja de ser interesante resaltar, en nuestra opinión, que en las condiciones *in vitro*, las células no están expuestas a las señales biológicas asociadas a las condiciones *in vivo*.

Funciones

La posición de la célula satélite es muy reveladora de su función. El hecho de que quede englobada por la lámina basal de la fibra muscular es sugerente de que su función está directamente relacionada con las necesidades funcionales de la propia fibra muscular. Dicho de otro modo, su característica posición refleja una inmediata sensibilidad y dependencia de la integridad mecánica y funcional de la fibra muscular (Yablonka-Reuveni, 2011).

La CMS juega un papel fundamental en la homeostasis del crecimiento postnatal, la hipertrofia, reparación y regeneración del músculo esquelético (Luque *et al*, 2011). El hecho de que la CMS se encuentre confinada por la lámina basal en el territorio de la fibra muscular es señal de que su papel, al menos fundamentalmente, se relaciona íntimamente con las necesidades de la fibra muscular a la que se asocia. Es decir, reemplazando a segmentos degenerativos de la fibra muscular (*regeneración*), reparando pequeñas microlesiones que no conllevan la muerte de la fibra (*reparación*), fusionándose con la fibra muscular para incrementar la dotación de mionúcleos (*hipertrofia*), además de considerar la posibilidad de que la CMS abandone a la fibra muscular a la que se asocia para formar nuevas fibras (*hiperplasia*).

1) Renovación mionuclear

Dado el carácter amitótico de los mionúcleos de la fibra muscular, la renovación de estos parece depender de la CMS. Se ha estimado que, en un músculo normal de rata, no más del 1-2% de los mionúcleos se renuevan cada semana (Schmalbruch y Lewis, 2000).

2) Autorenovación

Es interesante destacar que, en el músculo esquelético adulto, el compartimento de CMSS se mantiene a pesar de los ciclos de degeneración-regeneración, lo que indica la existencia de mecanismos de autorenovación y quiescencia (Schultz y Jaryszak, 1985; Pawlikowski *et al*, 2015).

3) Regeneración de la fibra muscular

La regeneración muscular es un proceso complejo espacio-temporal de acontecimientos moleculares, celulares y tisulares coordinados por los efectos de factores crecimiento y componentes de la matriz extracelular, interacciones célula-célula y célula-matriz. En él se incluye la determinación de las CMS células madre hacia la línea miogénica, su proliferación, diferenciación, fusión en miotubos y crecimiento y maduración en fibras musculares. Se trata de un proceso similar, pero no idéntico, a la miogénesis embrionaria, con la que comparte características celulares y moleculares comunes (Grounds, 1999; Tajbakhsh y Relaix, 2011).

En la regeneración muscular se distinguen las fases de **degeneración o destrucción**, **regeneración o reparación** y remodelación (Järvinen *et al*, 2005; 2007). Básicamente, la fase degenerativa incluye la destrucción del área afectada y la respuesta inflamatoria. Tras ésta, la fase de regeneración se caracteriza por la activación, proliferación y diferenciación de las CMSS, su fusión en miotubos o fibras musculares regenerativas y la maduración de estos hacia miofibras adultas. En esta fase la persistencia de la lámina basal de la fibra muscular tras la lesión garantizará que las CMSS proliferen dentro de sus límites, se diferencien hacia mioblastos y se fusionen entre sí para formar miotubos multinucleados y con las partes supervivientes de las fibras lesionadas.

En la fase de remodelación, y simultáneamente con el crecimiento y maduración de los miotubos regenerativos o fibras musculares regenerativas, otros elementos tisulares como la matriz extracelular, red vascular y nervios sufren notables modificaciones y cuyo papel es fundamental para garantizar la recuperación morfológica y funcional del músculo: o sea, adecuada oxigenación, recuperación de la innervación y tensión longitudinal (Grounds *et al*, 1998; Velleman *et al*, 1998). En esta fase la CMS continúa jugando un papel esencial, ya que actúan suministrando nuevos mionúcleos que permitan el crecimiento de la fibra regenerativa (Luque *et al*, 1996).

4) Reparación de la fibra muscular

El término de “reparación” de la fibra muscular se refiere a la restauración de uno o más elementos dañados tras una lesión que no conduce a la muerte de la fibra muscular o a un segmento de esta. Es, por tanto, distinto al término de “regeneración” de la fibra muscular, en la cual el proceso conlleva a la formación de una nueva fibra (o a un segmento de esta) tras la necrosis (Carpenter, 2001).

En estos casos se han descritos CMSS activadas asociadas a fibras musculares con microlesiones provocadas por el ejercicio, sin que evolucionaran a la necrosis de la fibra (Magaudua et al, 2004). En biopsias musculares de corredores de maratón se han observado CMSS junto con fibras que mostraban focos de lisis miofibrilar, dilatación y rotura de tubos T y degeneración mitocondrial sin infiltración inflamatoria (Wharhol et al, 1985).

5) Hipertrofia de la fibra muscular

Al tratarse la fibra muscular esquelética de una célula grande, de gran longitud, su funcionamiento requiere la existencia de cientos de núcleos (mionúcleos) que gobiernan determinados territorios intracelulares, concepto denominado “unidad de ADN” o “dominio mionuclear”; es decir, cada mionúcleo controla un volumen definido de citoplasma, de tal manera que cuando una fibra muscular incrementa su tamaño se hace necesaria la incorporación de nuevas unidades de ADN o mionúcleos. Dado que estos no pueden dividirse, el suministro de los nuevos mionúcleos se lleva a cabo a partir de la población de CMSS. De esta manera la adición de nuevos mionúcleos a la fibra muscular permite incrementar la capacidad para la síntesis proteica y mantener el aumento en el área transversal de la fibra (Allen *et al*, 1999; Hawke, 2005; Freyssenet, 2006; Blaauw y Reggiani, 2014).

En general, las CMSS se activan e incrementan su número en respuesta al estímulo hipertrófico. Aunque los mecanismos que conducen a su activación durante la hipertrofia no son completamente conocidos, se ha propuesto que un ejercicio de entrenamiento de fuerza infringe microlesiones en las fibras musculares, no conducentes a la necrosis de las mismas, que liberarían factores de crecimiento estimulando la proliferación y diferenciación de las células satélites y fusionándose con la fibra muscular (Toigo y Boutellier, 2006; Pallafacchina *et al*, 2013); de esta manera la lesión inducida por el ejercicio estaría implicada en la propia hipertrofia de la fibra muscular.

Sin embargo, es necesario saber que pequeños incrementos en el área de las fibras pueden no implicar incorporación de nuevos mionúcleos a partir de las células satélites, sino que serían los propios mionúcleos existentes quienes incrementarían su capacidad de transcripción para hacer frente a las necesidades en la hipertrofia (Kadi *et al*, 2004; McCarthy *et al*, 2011)

6) Hiperplasia de fibras musculares

Son muchos los autores que señalan a la CMS como origen de nuevas fibras en el músculo esquelético adulto (Appel *et al*, 1988; Umnova y Seene, 1991; McCormick y Schultz, 1992; Yamada *et al*, 1989; Peña *et al*, 1995).

7) Crecimiento postnatal

Las CMSS juegan un papel muy importante en el crecimiento postnatal del músculo esquelético aportando mionúcleos para el crecimiento de la fibra muscular (Moss y Leblond, 1971). Por otro lado, las CMSS asociadas a fibras musculares en crecimiento presentan rasgos de activación (Schultz, 1976) mostrando desarrollo de retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi lo que indica la participación activa de la célula en la secreción de algunos productos como, por ejemplo, IGF (Jennische *et al*, 1987).

Propiedades

Evidentemente, para que las CMSS puedan desarrollar las funciones que tienen atribuidas poseen una serie de capacidades o propiedades que resumimos a continuación y que, en definitiva, confieren que la CMS sea la base de la plasticidad del músculo esquelético (Anderson, 2006; Luque *et al*, 2011):

- ***Cambio funcional:*** En el músculo esquelético normal las CMSS son quiescentes. Sin embargo, diferentes mecanismos pueden dinamizar a la célula satélite provocando que desde su situación de reposo o quiescencia pase a una situación de activación. La célula satélite activada también es conocida como mioblasto; tras la activación, la morfología de la CMS cambia radicalmente: aparición de extensiones citoplasmáticas, acompañadas de un aumento de volumen citoplasmático en el que se hacen evidentes varias organelas como aparato de Golgi, ribosomas, mitocondrias y retículo endoplásmico rugoso (Campion, 1985; Hawke y Garry, 2001)
- ***Capacidad proliferativa:*** a diferencia de los mionúcleos la CMS puede dividirse, aunque en condiciones de normalidad lo hacen muy infrecuentemente (Dhawan y Rando, 2005). El número de divisiones que experimenta la CMS / mioblasto es limitado (aproximadamente 25-30) y disminuye con la edad y en algunas patologías como la Distrofia Muscular de Duchenne (Bischoff and Franzini-Armstrong, 2004). Las células satélites humanas tienen una gran capacidad de proliferación *in vitro*, lo que las ha hecho muy útiles como arma terapéutica (Otto *et al*, 2009). Recientes estudios han puesto de manifiesto que existen dos modos distintos de división (asimétrica *versus* simétrica), que podrían variar como consecuencia de modificaciones microambientales (Gayraud-Morel *et al*, 2009)

- *Capacidad de autorenovación:* El potencial proliferativo de las CMS permite que la población pueda renovarse (Hawke y Garry, 2001).

- *Capacidad para la diferenciación:* tras la reacción de activación las CMSS transforman en mioblastos iniciando la diferenciación miogénica, expresándose un conjunto de moléculas específicas (Boonen y Post, 2008), tras lo cual queda capacitada para la fusión.

- *Capacidad para fusionarse:* las células satélites pueden fusionarse bien con la fibra muscular a la que se asocia o con otros mioblastos. Esta propiedad de la CMS o de los mioblastos derivados de ella es la base de su empleo en la terapia por transferencia de mioblastos para reparar y regenerar músculos lesionados o miopáticos o para su utilización como vectores en terapia génica (Morgan y Partridge, 2003)

En músculo humano se observan interdigitaciones y zonas de fusión entre las membranas plasmáticas de ambos tipos celulares en músculo deltoides hipertrófico (Reger y Craig, 1968) y en biopsias musculares de niños malnutridos tras una rehabilitación nutricional (Hansen-Smith, 1979). Appell *et al* (1988) también observan células satélites activadas fusionándose con fibras musculares en sujetos tras un programa de ejercicio en bicicleta ergométrica, sugestivas de su participación en los fenómenos de hipertrofia.

- *Motilidad y migración:* las células satélites pueden moverse a lo largo de la fibra muscular para contribuir a la reparación de segmentos dañados de ésta o, incluso, separarse de la fibra muscular a la que se asocian para, tras fusionarse con otros mioblastos, formar nuevas miofibras. Esto implica que la CMS puede moverse en dos direcciones: 1) a lo largo de la superficie de la fibra muscular a la que se encuentra asociada (lo que haría por debajo de la lámina basal y 2) hacia territorio intersticial, lo que implica “abandonar” la fibra muscular; en este caso existen dos posibilidades; la primera sería atravesar la lámina basal que la cubre y, en segundo lugar, rodearse completamente de lámina basal quedando aislada en el intersticio. Existen muy pocas evidencias de lo primero (Bischoff, 1994), mientras que la segunda posibilidad ha sido referida que ocurre en procesos de denervación (Ontell, 1975; Schultz, 1978; Lu *et al*, 1997; Viguie *et al*, 1997).

Se ha señalado que la capacidad migratoria de la CMS es dependiente de la integridad de la lámina basal. Después de la rotura de ésta tras una lesión traumática las CMSS pueden migrar a fibras musculares adyacentes (Watt *et al*, 1987; Watt *et al*, 1994)

A pesar de que parece evidente que la CMS puede emigrar, lo que no está claro es con qué frecuencia lo hace (Grounds y Relaix, 2009).

- *Alta resistencia a la lesión:* a diferencia de la fibra muscular, las células satélites son más resistentes a los agentes y situaciones lesivas lo que le permite regenerar a las fibras musculares, como se ha podido comprobar en estudios experimentales en los que agentes miotóxicos que provocan completa degeneración de las fibras musculares no afectan, aparentemente, a este tipo celular (Harris y Johnson, 1978; Maltin *et al*, 1983). Sin embargo, a pesar del alto grado de resistencia a la lesión las células satélites no están exentas de sufrir cambios degenerativos. Así por ejemplo Baranska *et al* (1997) han descrito hinchamiento mitocondrial con vacuolización y desintegración de sus crestas, inclusiones de lipofucsina y cuerpos lamelares situados en el espacio entre la CMS y la fibra muscular.

Heterogeneidad de CMSS

En el momento actual existen bastantes evidencias que demuestran que la población de CMS no es homogénea. La heterogeneidad se basa en varios aspectos: origen embriológico, al tipo de fibra (lenta o rápida) a la que se asocia, en la etapa postnatal en la que se encuentra, tipo de división (simétrica o asimétrica) (Biressi y Rando, 2010; Motohashi y Asakura, 2014). También al menos dos tipos de CMSS, “fusionantes” y “no fusionantes” han sido aisladas de músculo de diferentes especies (Baroffio *et al*, 1996).

Identificación microscópica

La identificación clara e inequívoca de la CMS se basa en criterios morfológicos y topográficos empleando el microscopio electrónico de transmisión. En la actualidad se están empleando una serie de marcadores en microscopía de luz que persiguen, no sólo identificar a esta célula sino también tipificarla en diferentes situaciones funcionales (Hawke y Garry, 2001). La doble inmunotinción con anticuerpos frente a moléculas ubicadas en el sarcolema (distrofina, espectrina) y la lámina basal (colágeno tipo IV, laminina $\alpha 2$) permite localizarlas gracias a su posición con respecto a la fibra muscular (Grounds, 1999; Boldrin y Morgan, 2012).

Sin embargo, la expresión de los diferentes marcadores empleados es confusa y, en muchas ocasiones, contradictoria (Thornell *et al*, 2003). Esto obedece probablemente a que, por un lado, la célula satélite muestre fenotipos diferentes, en su localización habitual por debajo de la lámina basal, en base a su situación funcional (quiescentes, activadas, replicativas, en diferenciación) y, de otro lado, al hecho de que la propia población de células satélites quiescentes sea heterogénea. Por otro lado, el aislamiento de células con potencialidad miogénica por disociación de tejido ha permitido numerosas caracterizaciones con marcadores

moleculares, pero la rapidez con la que estos pueden cambiar durante el procedimiento de aislamiento dificulta la identificación de las poblaciones o subpoblaciones de CMSS purificadas (Dhawan y Rando, 2005).

De todas maneras, son muchos los marcadores que se vienen empleando para identificar a las CMSS, ya sea en situación de quiescencia o de activación. Cuando la CMS se activa expresan, además de m-caderina y c-met, MyoD, Myf-5 y más tarde miogenina. (Cornelison y Wold, 1997; Beauchamp *et al*, 2000; Wernig *et al*, 2004). M-caderina es una molécula de adhesión dependiente del Ca^{2+} que se expresa tanto en las células satélites quiescentes como en las activadas, pero no en otros tipos celulares en el músculo esquelético; sin embargo, parece que no todas las CMS son marcadas con M-caderina (Kuschel *et al*, 1999). La inmunotinción con M-caderina de la célula satélite quiescente está confinada a la zona de aposición de las membranas plasmática de la célula satélite y de la fibra muscular dando lugar a una línea corta (<10um) y delgada en forma de arco junto al núcleo (Wernig *et al*, 2004). *c-met* es el receptor para el factor de crecimiento hepatocitario (HGF) y se expresa en todas las CMSS quiescentes y activadas (Tatsumi *et al*, 1998). Desmina es una proteína frecuentemente empleada para identificar CMS activadas ya que en las quiescentes su expresión es muy baja y rápidamente se expresa en respuesta al daño muscular (Lawson-Smith y McGeachie, 1998)

Es importante dilucidar el papel de los transcritores individuales *pax* en la miogénesis embrionaria y postnatal ya que esto puede tener implicaciones para el empleo de Pax7 como un gen candidato para la conversión de células madre hacia la línea miogénica, una estrategia de tratamiento importante frente a miopatías incrementando la regeneración muscular (Lamey *et al*, 2004; Yagima *et al*, 2010; Dilworth y Blais, 2011). Por el contrario, en ratones carentes de Pax7 los músculos se desarrollan normalmente, pero carecen de CMSS, lo cual determina un fallo en el aumento de la masa muscular (Seale *et al*, 2000). Aunque Pax7 está considerado como un buen marcador de CMSS, algunos estudios señalan que no todas las células se marcan (Reimann *et al*, 2004).

La miostatina (o GDF8), un miembro de la familia de los $\text{TGF}\beta$, se expresa en las CMSS quiescentes, sugiriendo que ésta puede promover activamente la quiescencia de una manera autocrina (Dhawan y Rando, 2005).

Regulación

En condiciones de normalidad la CMS se encuentra en la fase G_0 del ciclo celular y es resistente a los efectos de la mayoría de los factores de crecimiento (Bischoff, 1986b). La transición de la CMS de su estado de quiescencia al de activación ocurre por los requerimientos de los procesos proplásicos (especialmente bajo los que se establecen en la regeneración

muscular) y la secuencia de acontecimientos orquestados por muchos factores de crecimiento y factores reguladores miogénicos.

Un gran número de factores de crecimiento intervienen en la regulación de la actividad de la CMS (figs. 4 y 5) entre los que destaca IGF-I y MGF (Hawke y Garry, 2001). También ha sido propuesto el óxido nítrico como mediador en la rápida activación de la CMS, incluyendo la hipertrofia, y disminuyendo la adhesión a la membrana plasmática y lámina basal de la miofibra (Anderson, 2000).

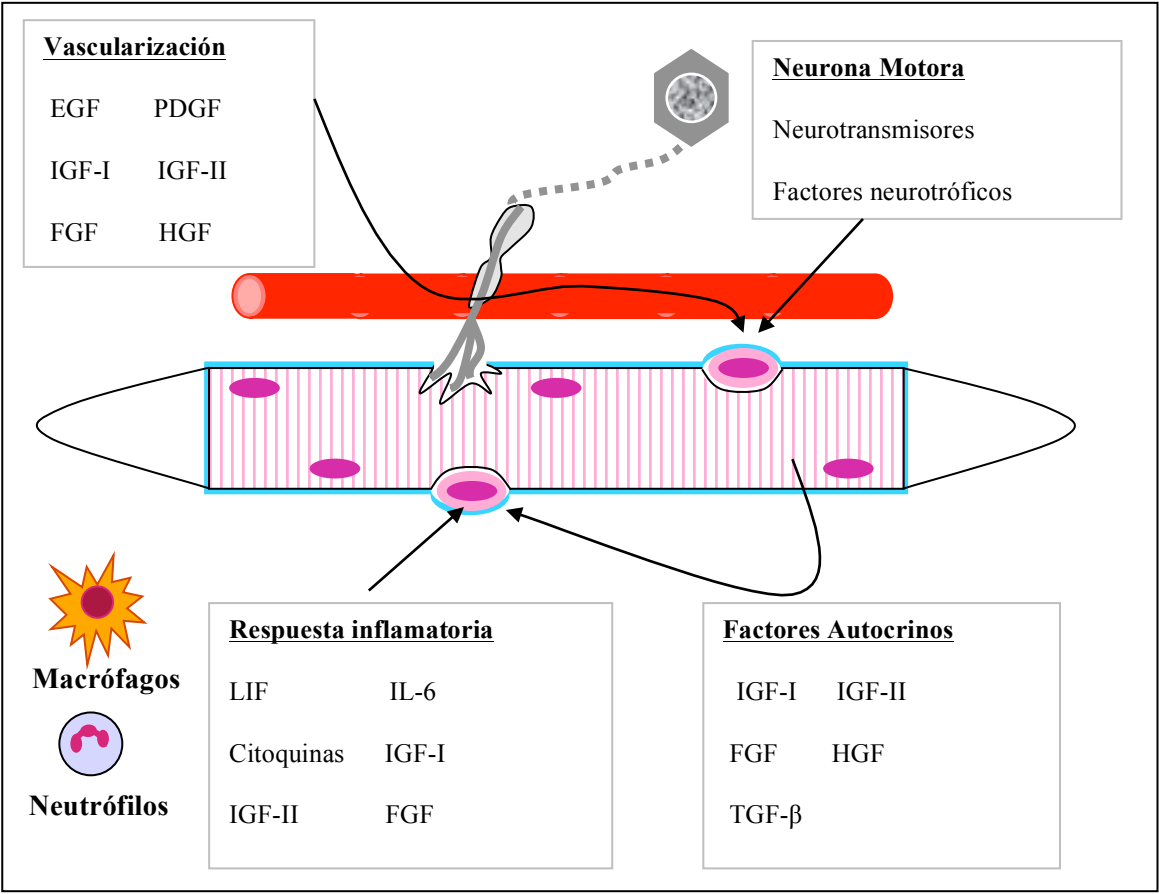


Figura 4. Esquema general que resume algunos de los factores que controlan y regula la actividad de las CMSS. (Tomado con autorización de Jimena y Peña, 2008).

<i>In vitro</i>			
Factor de crecimiento	Activación	Proliferación	Diferenciación
HGF	↑	↑	↓
FGF		↑	↓
IGF-1		↑	↑
IGF-2		↑	↑
MGF	↑		
LIF		↑	
TGF-β		↓	↓
<i>In vivo</i>			
HGF	↑		
FGF		↑	↓
IGF-1		↑	↑
IGF-2		↓	↓
MGF	↑		
LIF		↑	
TGF-β		↓	

Figura 5. Factores de crecimiento que afectan a la actividad de la CMS. (adaptado de Shortreed et al, 2008)

La CMS y otros tipos celulares con potencialidad miogénica

Son muchos los datos y evidencias que demuestran la existencia de diferentes tipos celulares, diferentes a la CMS, con potencialidad miogénica (fig. 6). Sin embargo, la contribución de estos a los procesos proplásicos del músculo esquelético (al menos en condiciones normales) es insignificante (Grounds *et al*, 2002; Collins, 2006) y su papel es fundamental en los procesos de regeneración muscular (Relaix y Zammit, 2012). Cossu y Biressi (2005) establecen la existencia de diferentes progenitores miogénicos: mioblastos

embrionarios, mioblastos fetales, CMSS, células madre musculares (MSC) y células madre hematopoyéticas (HSC).

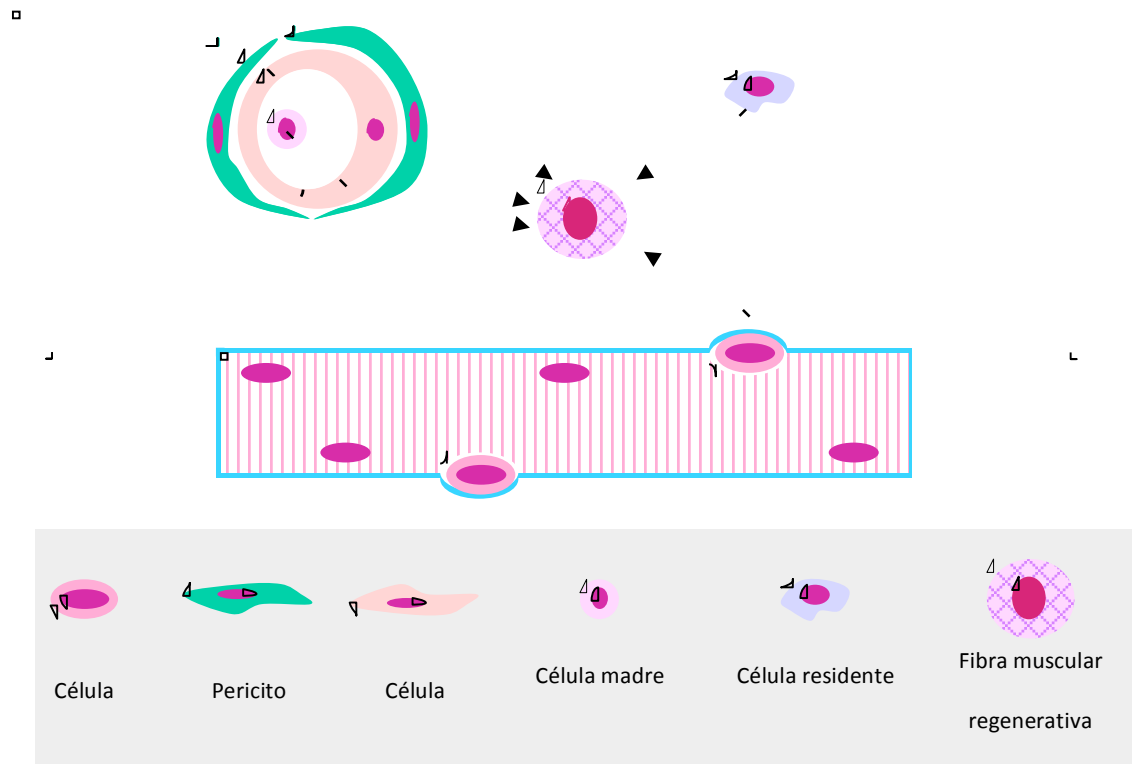


Figura 6. Células con potencialidad miogénica. (Tomado con autorización de Jimena y Peña, 2008).

Ha sido referido que la potencialidad miogénica del pericito no sólo se manifiesta en la capacidad de fusionarse directamente con fibras musculares dañadas sino también en la de repoblar los nichos de células satélite (Diaz-Manera *et al*, 2009; Dellavalle *et al*, 2011; Otto *et al*, 2012). Otra posibilidad que merece ser tomada en consideración se refiere al hecho de que los mionúcleos puedan originar mioblastos en músculo adulto de mamífero, lo que si ocurre en anfibios (Grounds *et al*, 2002).

La célula miosatélite en el músculo patológico

La información sobre el papel y/o afectación de la CMS en el músculo patológico humano es limitada. Esto obedece a tres motivos: 1. es una célula raramente vista en las pequeñas biopsias, 2. precisa para su correcta identificación de la microscopía electrónica y 3. no posee un valor diagnóstico en miopatología (Zhang y McLennan, 1994). En cualquier caso,

se piensa que los aspectos biopatológicos de este tipo celular son, en gran medida, similares a la que presenta en la musculatura esquelética de otros mamíferos.

Desde un punto de vista general y considerando el papel que la CMS juega en los procesos proplásicos del músculo esquelético resulta evidente su implicación en aquellos cuadros patológicos que cursan con fenómenos degenerativos de las fibras musculares, especialmente en las distrofias y las miopatías inflamatorias, aunque también responden a trastornos de origen neurogénico. Aunque no se puede establecer una clara diferencia en el comportamiento de la CMS en estos dos grandes grupos, podría ser posible obtener alguna información que nos ayude a entender como los mecanismos proplásicos pueden estar dificultados, comprometidos o anulados en determinadas enfermedades neuromusculares y, en definitiva, comprender mejor su fisiopatología, así como para fundamentar el diseño de posibles estrategias terapéuticas.

En este último sentido la implicación de la CMS en la patología neuromuscular humana también debe de analizarse desde un punto de vista terapéutico. Aunque se ha avanzado mucho, aún existen numerosas cuestiones sin resolver en lo que se refiere a las señales intrínsecas y extrínsecas que regulan a la CMS y que son fundamentales para aplicar con éxito las estrategias terapéuticas en medicina regenerativa (Cao et al, 2005; Sherwood y Wagers, 2006; Kuang y Rudnicki, 2008).

Por tanto, en este apartado, para facilitar la comprensión de su comportamiento en la patología neuromuscular, consideraremos inicialmente estas respuestas generales, seguida del análisis de su respuesta en la lesión muscular de tipo miopático y en las de origen neurogénico a partir de la información obtenida de biopsias musculares humanas. Finalmente comentaremos resumidamente su papel como elemento terapéutico en el tratamiento de las enfermedades neuromusculares.

Considerando las funciones y propiedades de las CMSS se puede entender que las anomalías o disfunciones de éstas dificultarán o abortarán las respuestas proplásicas del músculo esquelético favoreciendo el desarrollo y evolución de la enfermedad muscular. No sólo hay que considerar un problema intrínseco que afecta a la población de CMSS sino a una

alteración de las señales o del microambiente tisular que las regula incluyendo el control génico (Muntoni *et al*, 2002; Jejurikar y Kuzon, 2003).

Analizando la bibliografía existente, el comportamiento de la CMS en la patología neuromuscular humana se podría resumir en las siguientes respuestas (fig.7):

- Cambios degenerativos de la CMS
- Reducción de la capacidad proliferativa de la CMS
- Reducción de la capacidad para la diferenciación miogénica de la CMS
- Reducción de su capacidad para la fusión
- Incremento en el número de CMSS
- Disminución en el número de CMSS

Estos cambios, que pueden o no coexistir en una misma enfermedad neuromuscular, pueden presentarse tanto en las lesiones de tipo miopático como en las lesiones musculares de origen neurogénico.

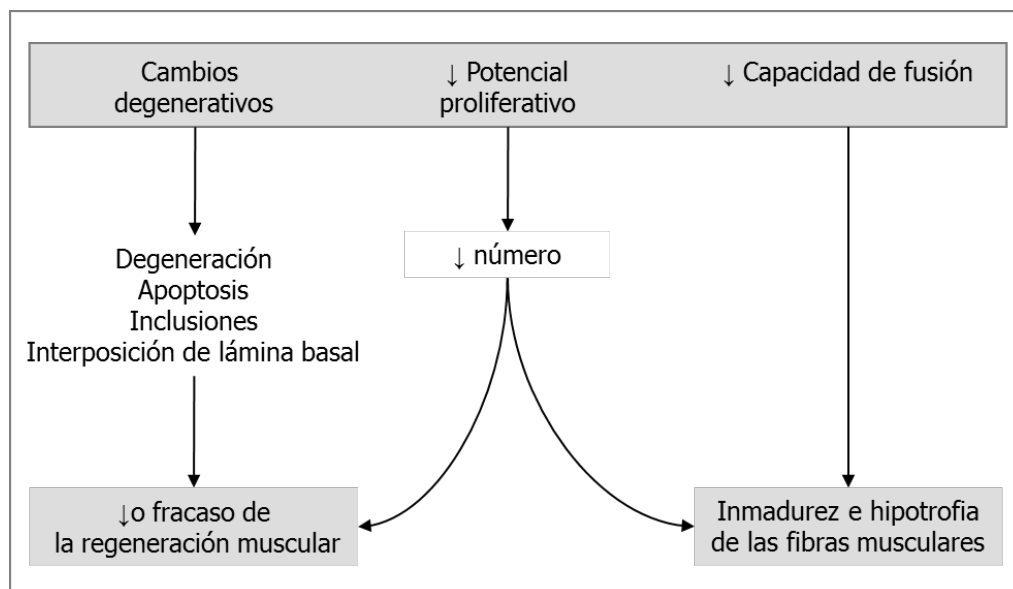


Figura 7. Principales cambios patológicos que pueden ocasionar la afectación patológica de la población de CMSS.

Implicación de la CMS en el fracaso de la respuesta regenerativa

Una eficiente regeneración requiere del reclutamiento de las CMSS y dado que esta población es la principal responsable, si no la única, del potencial regenerativo del músculo esquelético, cualquier afectación pueden condicionar la respuesta regenerativa del músculo esquelético frente a la lesión.

Cambios degenerativos de la CMS.

Aunque en general a la CMS se le atribuye un elevado grado de resistencia a la lesión, gracias a la cual mientras que la fibra muscular sufre degeneración, esta célula se activa, prolifera y se diferencia hacia mioblasto participando en la regeneración o reparación de la fibra muscular, existen algunas referencias, aunque escasas, que informan sobre cambios degenerativos en las CMSS. En este sentido, pensamos que sería de interés profundizar en esta cuestión puesto que la afectación directa de la población de CMSS en determinados procesos patológicos, y en concreto con determinados cambios citoarquitecturales que afectan a la propia fibra muscular, podría ayudar a aclarar o entender las dificultades que el músculo esquelético encuentra para hacer frente a la lesión o activar su crecimiento.

En músculo patológico humano, aunque no indican qué patología afectaba a la muestra muscular, se han descrito ocasionales CMSS en degeneración que muestran picnosis nuclear, vesiculación de la carioteca y mitocondrias alteradas (Aréchaga *et al*, 1979). Cambios similares se han observado en la Dermatomiositis (Engel y Banker, 2004). También se ha sugerido que tanto el estrés oxidativo como el producto de la lesión oxidativa conducen a su apoptosis, dificultando o impidiendo la regeneración del músculo diafragma del ratón *mdx* (Nakae *et al*, 2001) y en biopsias de afectos de Distrofia Muscular de Duchenne (Sandri *et al*, 1998). Frente a esto las CMSS en músculo esquelético denervado no revelaron expresión de caspasa (Tews *et al*, 2002).

En determinados trastornos metabólicos que incluyen depósitos de material en fibras musculares también se presentan en el citoplasma de la CMS como es el caso de la enfermedad de Pompe (Winkel *et al*, 2003) o en enfermedades de depósito lisosomal como es el caso de la deficiencia de maltasa ácida en la que las CMSS contienen lisosomas al igual que las miofibras (Engel y Banker, 2004). Es posible que esto implique un defecto en su activación ya que recientemente se ha informado que, aunque en la enfermedad de Pompe se mantiene estable el número de células Pax7+, no se observa tinción para MyoD y miogenina lo que sugiere un

déficit en su activación (Schaaf *et al*, 2015). Ocasionalmente se ha descrito incluso una mayor afectación de las CMSS que en las fibras musculares en el caso de la Mucopolipidosis tipo II (Kula *et al*, 1984). Sin embargo, en miopatías congénitas en las que las fibras musculares presentan inclusiones anormales (miopatía en huella de dedo, de cuerpos reducidos o cuerpos cebrá, etc.) no se señala si estas inclusiones pueden ser vistas en las propias CMSS.

Dado que el principal papel de este tipo celular es el de actuar en los procesos reparativos y regenerativos de la fibra muscular, sería interesante conocer las características de las CMSS que se asocian a diferentes tipos de fibras musculares con cambios degenerativos y/o citoarquitecturales. Sin embargo, tampoco existen datos sobre los rasgos morfológicos de las CMSS asociadas a otros tipos de fibras degenerativas como las fibras *ragged red* o fibras *core* habituales en las miopatías mitocondriales y miopatía de *central core* respectivamente. Por el contrario, si existe alguna información sobre las CMSS asociadas a las denominadas fibras en anillo (*ring fibers*); en este caso se describen con rasgos de activación (Kinklerfus, 1967) e incluso han sido implicadas directamente como responsables de la formación de este tipo de anomalía citoarquitectural (Chou y Nonaka, 1977). En este caso es posible que las células satélite estén implicadas en procesos de reparación de la fibra ya que estudios experimentales sugieren que las fibras en anillo son consecuencia de anomalías en la reparación/regeneración de fibras musculares (Peña *et al*, 2001; Peña *et al*, 2007).

Otro cambio degenerativo se refiere a la interposición de lámina basal entre la fibra muscular y la CMS. Laule y Bornemann (2001) encuentran que la interposición de lámina basal entre ambas células es un cambio que sólo se observa en músculo patológico y especialmente en las atrofas neurogénicas, lo que sugiere un control neural en la adhesión de las células satélite a la fibra muscular. Esta anomalía también ha sido observada en casos de enfermedad de Werdnig-Hoffmann (van Haelst, 1970) y en biopsias musculares de niños con malnutrición (Hansen-Smith *et al*, 1979).

Cambios funcionales de la CMS: Disminución de la capacidad proliferativa y número de CMSS

El incremento en la frecuencia de células satélite es visto como un reclutamiento de este tipo celular como respuesta regenerativa frente a la lesión o para el reclutamiento de nuevos mionúcleos. En este sentido, el número absoluto de CMS se encuentra disminuido en la Distrofia Muscular de Duchenne (DMD). Los estudios realizados sobre esta patología apuntan a una temprana senescencia de la CMS derivada de la existencia de ciclos acelerados de

degeneración muscular y proliferación. Pero no parece ser este el único factor implicado ya que se ha detectado, en músculo de pacientes afectados de DMD, un aumento de la apoptosis en CMS (además de mionúcleos y macrófagos (Sandri *et al*, 1998) que parece estar ligada a modificaciones en el microambiente tisular del músculo distrófico y en concreto a una disponibilidad limitada de IFG-I e IGF-II (Melone *et al*, 2000).

Renault *et al* (2002a) han demostrado que la capacidad proliferativa de las CMSS derivadas de músculo de una paciente de 9 años afecto de Distrofia muscular de Duchenne es aproximadamente un tercio de la que presentan las obtenidas de músculos controles. Decary *et al* (2000) han demostrado que la disminución en la capacidad regenerativa en la distrofia muscular de Duchenne es debida a una senescencia prematura de las células satélites provocada por su excesiva proliferación durante la regeneración muscular. En los pacientes afectados de DMD la reserva de CMSS se agota como consecuencia de los continuos ciclos de degeneración y regeneración (Heslop *et al*, 2000), quedando comprometida su función y por tanto favoreciendo la degeneración muscular y la evolución a la sustitución del tejido muscular esquelético por tejido fibroso y tejido adiposo. En otros tipos de distrofias como es el caso de la distrofia muscular congénita tipo Fukuyama, el número de CMSS no se ve afectado (Terasawa, 1986).

Los estudios sobre envejecimiento con animales experimentales han llevado a la conclusión general de que el número de células satélites disminuye con la edad, lo que conllevaría una disminución en la capacidad adaptativa y regenerativa del músculo esquelético en esta fase de la vida (Renault *et al*, 2002c). Por contra, otros estudios revelan que no existen diferencias cualitativas ni cuantitativas en la población de células satélites entre individuos jóvenes sanos sedentarios y personas de edad avanzada de ambos sexos (Roth *et al*, 2000). Sin embargo, recientes estudios apuntan a que la disfunción de las CMSS en el envejecimiento puede estar provocada por alteraciones del microambiente tisular como podría ser la inflamación sistémica crónica que afecta a individuos de edad avanzada en las que una citoquina, como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), es conocido, que afecta negativamente a la capacidad regenerativa al desestabilizar el factor de transcripción MyoD e inducir apoptosis de la CMS (Degens, 2010). Otro argumento que se ha propuesto para justificar el retraso o dificultad para la activación de las CMSS en el envejecimiento ha sido la acumulación de lipofucsina en las fibras musculares (Renault *et al*, 2002a)

No deja de ser muy interesante la observación de que el potencial de proliferación y diferenciación *in vitro* de CMSS obtenidas de músculos de sujetos de edad avanzada parezca ser suficiente para la regeneración (Renault *et al*, 2000b), su reclutamiento *in vivo* sí parece estar dificultado (Dreyer *et al*, 2006). Este distinto comportamiento podría explicarse porque el microambiente tisular *in vivo* en el que se encuentra las CMSS difiera según la edad del individuo. Conboy *et al* (2005) hablan de un “rejuvenecimiento” de las CMSS de ratas viejas cuando se exponen *in vitro* al suero de animales jóvenes, lo que sugiere claramente que sustancias circulantes afectan a la capacidad de las células miosatélites.

Implicación de la CMS en los procesos de hipotrofia y atrofia muscular

La atrofia de fibras musculares (como la que se establece en la pérdida de inervación o en el desuso) o la hipotrofia por inmadurez de las fibras musculares (como ocurre en miopatías congénitas y algunas distrofias) son cambios patológicos muy frecuentes en patología neuromuscular.

Puesto que las CMSS son necesarias para el crecimiento de las fibras musculares en el desarrollo postnatal (Schultz, 1996) y para el crecimiento de las fibras musculares regenerativas (Luque *et al*, 1996) un menor número de aquellas implicaría una menor disponibilidad para contribuir al crecimiento de las miofibras. Por consiguiente, resulta evidente de que si una de las funciones de la CMS es la de suministrar nuevos mionúcleos que permita controlar coordinadamente el crecimiento de las fibras musculares, su disminución en número, la alteración de su capacidad proliferativa o de su capacidad de fusión afectaría directamente al crecimiento de la fibra muscular.

Los cambios cuantitativos en la población de CMSS pueden ofrecer alguna información sobre la fisiopatología de la enfermedad. Si bien el incremento en el número de células satélites podría, inicialmente al menos, hacer pensar en una respuesta positiva frente a la lesión, como se deduce de los estudios experimentales, en el caso de la patología muscular podría estar indicando todo lo contrario.

En varias patologías se ha hecho referencia a una disminución en el número de CMSS. En la miopatía miotubular, donde las miofibras sufren un proceso de detención en su crecimiento, se observan muy pocas células satélites asociadas a ellas a diferencia de lo que ocurre con el músculo fetal, pero tienen una frecuencia similar a la del músculo neonatal (Sarnat, 1990). Sin embargo, cuando se cultivan CMSS de pacientes con miopatía miotubular ligada a X se forman los miotubos (van der Ven, 1995), lo que plantea que, al menos en este cuadro sería la menor disponibilidad de CMSS y no su capacidad de fusión la que contribuye a

la inmadurez del músculo. Ontell (1986) también ha sugerido que la pobreza de células satélites asociadas a fibras musculares regenerativas de músculo distrófico podría originar una inhibición en el crecimiento de estas fibras.

En experimentos de denervación crónica se atribuye, entre otros motivos, que el fracaso de la respuesta regenerativa es consecuencia de una ausencia de CMSS asociadas a los miotubos regenerativos (Borisov *et al*, 2001; Dedkov *et al*, 2001) algunas de las cuales quedarían separadas de las miofibras conduciendo a la aparición de pequeñas fibras musculares inmaduras reflejando una respuesta abortiva miogénica (Borisov *et al*, 2005) que podría explicar la presencia de este tipo de fibras en biopsias musculares humanas de pacientes con polineuropatías y esclerosis lateral amiotrófica (Doppler *et al*, 2008).

Sin embargo, una mayor densidad o incremento en el número de CMSS puede también ser expresión de la inmadurez de un músculo. En estos casos podríamos estar ante un problema o dificultad en la capacidad de fusión de las CMSS con la fibra muscular; esto ocasionaría una detención en su crecimiento y maduración o hipotrofia o bien el problema podría radicar en un problema intrínseco de la fibra muscular o de una ausencia de las señales que controlen la fusión. Por ejemplo, mientras que en la polimiositis se describen fibras regenerativas con CMSS activadas asociadas (Swash *et al*, 1978), en la distrofia muscular humana progresiva las fibras musculares regenerativas muestran CMSS inactivas (Laguens, 1963) al igual que en la enfermedad de *central core* (Cullen y Mastaglia, 1982). Este carácter de inactividad también se ha observado en las CMSS asociadas a las fibras musculares atroficas de biopsias de pacientes con enfermedad de Werdnig-Hoffmann (fig.8) (Chou y Nonaka, 1977).

Este es el caso de lo referido en biopsias musculares de afectos de Distrofia Miotónica tipo 1 (Amack y Mahadevan, 2004; Thornell *et al*, 2009) y en la miopatía nemalínica (Nonaka y Tojo, 1983). En ambos casos se han observado que el número de CMS se encuentra incrementado significativamente, lo que sugiere que, aunque este aumento pudiera representar una inicial respuesta, existiría una disfunción básica posiblemente relacionada con la fusión (Fardeau, 1982) que impediría su contribución al crecimiento de las fibras musculares y, por tanto, a la progresiva atrofia muscular (Amack y Mahadevan, 2004; Thornell *et al*, 2009).

Por otro lado ¿es posible que las células satélites se activen, pero que sean incompetentes para la fusión? Si esto es así las células satélites podrían desarrollar miofilamentos en su interior y quedarían atrapadas entre la fibra a la que se asocian y la lámina basal. Se han descrito miofibrillas en el citoplasma de células satélites en la DMD (Wakayama, 1976) y en hipotiroidismo congénito (Gori *et al*, 1971).

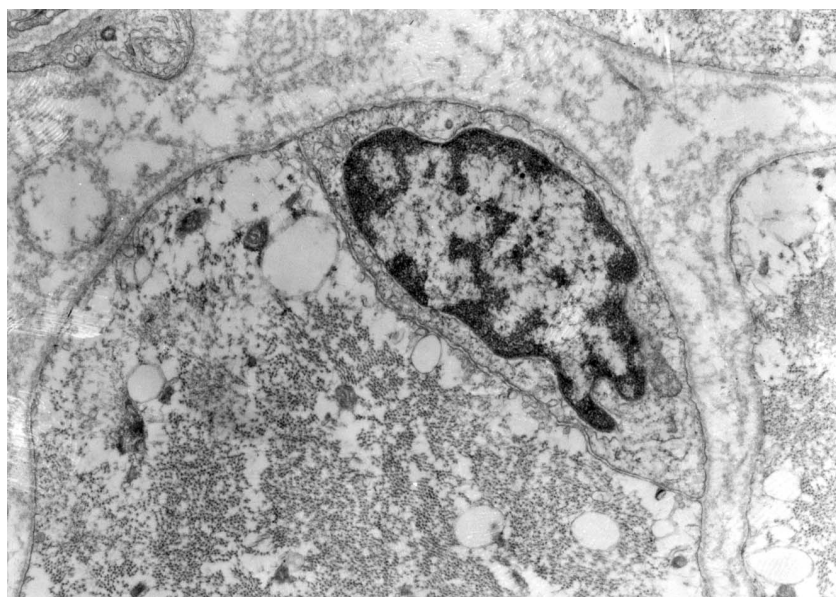


Figura 8 Micrografía electrónica en la que se observa una CMS inactiva asociada a una fibra muscular atrófica en la enfermedad de Werdnig-Hoffmann. (Archivo fotográfico del Grupo de Investigación REGMUS. Área de Histología. Facultad de Medicina y Enfermería. UCO).

Guettier-Sigrist *et al* (2002), empleando un modelo de cocultivo de motoneuronas y CMSS (y considerando que no reproduce la situación *in vivo*) sugieren que la atrofia muscular espinal es una disfunción del “diálogo” músculo-nervio, en concreto un defecto en la función neurotrópica de la fibra muscular. Estos autores plantean que las CMSS derivadas de pacientes con atrofia muscular espinal, aunque se fusionan entre sí formando miotubos en cultivos son incapaces de diferenciarse, fusionarse correctamente y de madurar.

Otras implicaciones patológicas de las células satélites

Ha sido demostrado que las CMSS poseen la capacidad de dar lugar a células osteogénicas y adiposas *in vitro* tras el tratamiento con proteínas morfogenéticas de hueso o inductores adipogénicos respectivamente (Asakura *et al*, 2001). A pesar de que no existe evidencia directa *in vivo* de esta conversión, la formación de hueso ectópico y de tejido adiposo dentro del músculo bajo ciertas condiciones patológicas sugiere, indirectamente, que esta transformación de la CMS podría ocurrir (Holterman y Rudnicki, 2005). Recientemente se ha referido que las CMSS presentan receptores para la proteína morfogenética de hueso (Schindeler *et al*, 2009). Finalmente, las CMSS han sido señaladas como el origen del rhabdomyosarcoma (Le Grand y Rudnicki, 2007).

La célula satélite como elemento terapéutico en las enfermedades neuromusculares

En los últimos años estamos asistiendo a un notable interés por la utilidad de la CMS, junto con otros tipos de células con potencialidad miogénica, como arma terapéutica en el campo de la neurología donde la práctica totalidad de las enfermedades neuromusculares carecen de tratamiento efectivo (Otto *et al*, 2009). Aunque se desconocen muchos aspectos, lo cierto es que los avances en el conocimiento del control molecular de este tipo celular y de otros tipos celulares con potencialidad miogénica, así como las mejoras introducidas en las técnicas de terapia celular e ingeniería tisular, están aportando grandes e interesantes expectativas en el tratamiento de la patología neuromuscular (Bareja y Billin, 2013).

El fundamento de esta potencialidad terapéutica se basa en el hecho de que es una célula madre (fig.9). En este sentido Zammit (2008) destaca su utilidad como “modelo” para el estudio de las células madre adultas por su carácter representativo de esta población y estar bien definida, lo que hace que pueda ser fácilmente identificada y obtenida rápida y fácilmente. Además, a diferencia del tejido hematopoyético, el tejido muscular es muy estable con un bajo grado de renovación, lo que facilita el estudio de los mecanismos de control de sus situaciones de quiescencia y activación.

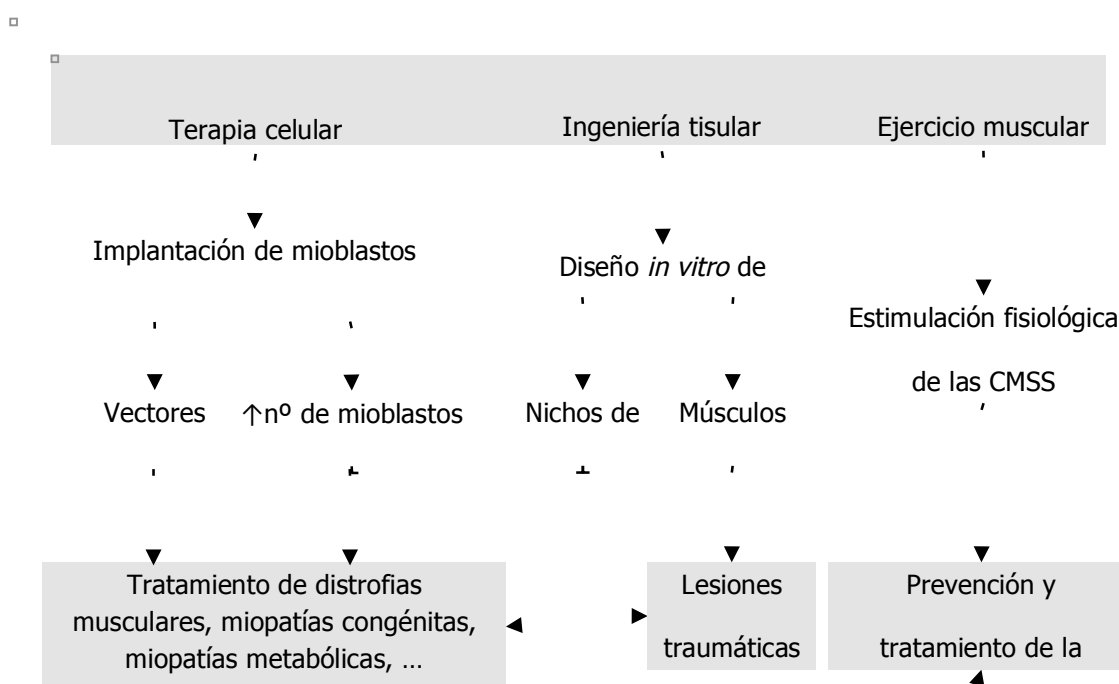


Figura 9. Papel terapéutico de la CMs

Terapia por transferencia de mioblastos derivados de CMSS

Ya que las CMSS se fusionan para formar miotubos multinucleados contribuyendo sus núcleos a crear un *pool* genético común en un sincitio, se sugirió la posibilidad de disponer de un magnífico vector para la transferencia génica. Dado que la fibra muscular esquelética tiene una gran estabilidad debido al mínimo recambio celular y a su capacidad para incorporar por fusión precursores miogénicos mononucleados, el músculo adulto representa un órgano ideal para la terapia génica (Negroni *et al*, 2006).

El empleo de la terapia celular en el músculo tiene dos ventajas: 1. las células pueden liberar productos génicos normales a las miofibras y 2. pueden incrementar la regeneración (Cao *et al*, 2005). Pero su eficacia se ve limitada por el inconveniente de ser liberada por vía sistémica; también posee el inconveniente de la imposibilidad de ser liberadas intravascularmente lo que disminuye su eficacia (Le Grand y Rudnicki, 2007).

La CMS fue el primer tipo celular empleando en la terapia celular o transferencia de mioblastos en la DMD. A pesar de que los buenos resultados obtenidos en los estudios experimentales con ratones distróficos *mdx* inyectados intramuscularmente con CMSS cultivadas de ratones *wild-type* (Partridge *et al*, 1989) desafortunadamente los resultados en humanos han sido ineficaces (Peault *et al*, 2007) aunque se están consiguiendo nuevos avances y mejoras (Darabi *et al*, 2008).

En la actualidad parece ser que la CMS no es una opción válida para su utilización en la terapia celular para el tratamiento de la DMD. Una de las razones estriba en que el mantenimiento *in vitro* de mioblastos derivados de CMSS provoca una reducción de su miogenicidad además de la dificultad de obtener suficiente cantidad de estas células (Farini *et al*, 2009). Por estas razones las investigaciones actuales se dirigen a optimizar este tipo de terapia empleando otros tipos celulares con capacidad miogénica diferentes a la CMS y que incluyen a células madre derivadas de músculo, células SP (*side population*) y células madre musculares derivadas de médula ósea. Para Cossu y Biressi (2005) la selección del tipo celular más apropiado debería cumplir los siguientes criterios: obtenerse a partir de una fuente accesible, capacidad para crecer *in vitro* formando una población homogénea, ser susceptible de ser transducidos *in vitro* con vectores génicos, ser capaces de alcanzar por vía sistémica los territorios musculares degenerativos-regenerativos y la capacidad para diferenciarse *in situ* hacia nuevas fibras musculares fisiológicamente normales.

En cualquier caso, la posibilidad más prometedora en el tratamiento de la DMD requerirá, junto a la terapia celular, la terapia génica y los tratamientos farmacológicos (Price *et al*, 2007; Farini *et al*, 2009; Ichim *et al*, 2010; Rinaldi y Perlingeiro, 2014)

CMSS e ingeniería tisular de músculo

Determinadas situaciones en las que nos encontramos con una notable pérdida de masa muscular requieren de estrategias dirigidas a la reconstrucción muscular mediante técnicas de ingeniería tisular (Bach *et al*, 2004). Actualmente las CMS constituyen la primera elección como fuente de células madre miogénicas para su utilización en ingeniería tisular de músculo esquelético (Koning *et al*, 2009) en combinación con *scaffolds* poliméricos *in vitro* o transportadores biodegradables (microcápsulas) (Tanzi *et al*, 2006). Sin embargo, cuando las CMSS son aisladas pierden el entorno que influye sobre su función lo cual determina una limitación en su utilidad clínica ya que pierde algunas de sus propiedades como células madre; por esta razón algunos autores trabajan en el desarrollo de microambientes *in vitro* en los cuales puedan ser recreados y modulados los nichos de CMSS mediante técnicas de ingeniería tisular (Cosgrove *et al*, 2009).

Este tipo celular también ha sido empleado para terapia celular e ingeniería tisular en músculo cardíaco (Chiu *et al*, 1995) (aunque los mioblastos derivados de ellas parecen ser menos efectivos que las células madre derivadas de músculo) y en la disfunción urológica (Menasché, 2003; Yiou *et al*, 2003; Usas y Huard, 2000; Tudesco *et al*, 2010).

Por otro lado, estas células están siendo consideradas como una alternativa en estrategias de ingeniería tisular para hueso y cartílago. Schindeler *et al* (2009) proponen que las CMSS podría jugar un papel muy importante en los procesos de reparación de la fractura ósea en situaciones en las que no pueda existir disponibilidad de progenitores derivados de médula ósea o del periostio (eliminación o desbridamiento perióstico). Adachi *et al* (2002) han comprobado que la implantación de células madre derivadas de músculo en defectos articulares creados en conejos consiguen una curación de la lesión con una eficiencia equivalente al trasplante de condrocitos.

CMSS y ejercicio

La actividad física puede proveer efectos beneficiosos (Lynch *et al*, 2007; Verney *et al*, 2008), aunque no parecen existir prescripciones de ejercicio con un efecto específico, para la prevención y o tratamiento de la sarcopenia y enfermedades metabólicas (Toigo y Boutellier,

2006). El fundamento de esto se apoya en el hecho de que en individuos con sarcopenia, el descenso de la población de CMSS podría explicar que exista una mayor prevalencia de lesiones musculares, escasa capacidad para responder al estímulo hipertrófico, el retraso de la regeneración muscular y la más lenta recuperación tras una intensa sobrecarga (Kadi y Ponsot, 2010).

Se ha observado un incremento en la frecuencia de células satélites en ancianos sometidos a un entrenamiento de resistencia (endurance), por lo que se considera como estrategia eficaz en la mejora de la función en el anciano (Andersen, 2003; Charifi *et al*, 2003; Thornell *et al*, 2003; Kadi y Ponsot, 2010). Por el contrario, Jackson *et al* (2015) ha mostrado que la ausencia de CMSS puede perturbar la coordinación motora por alteración en las fibras musculares intrahusales, lo que le confiere un papel no identificado en la función muscular.

Material y métodos	43
Animales y diseños experimentales.....	45
Extractos musculares.....	45
Primer experimento: ensayo de extractos musculares de distintos músculos en ratas normales.	46
Segundo experimento: ensayo de extractos de músculo sóleo en ratas con atrofia muscular.	47
Análisis en microscopía óptica.....	47
Técnicas histológicas, histoquímicas e inmunohistoquímicas	
Estudio histomorfométrico	
Análisis en microscopía electrónica de transmisión.....	51
Cortes semifinos y ultrafinos	
Estudio histomorfométrico	
Análisis estadístico.....	53

Animales y diseños experimentales

En este estudio se emplearon un total de 80 ratas Wistar (250-300 g de peso). Las ratas estuvieron alojadas en un box con temperatura controlada (24°C), mantenidas en un ciclo de luz-oscuridad de 12-12 horas y con acceso a alimento y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos descritos en este estudio para el cuidado y experimentación con los animales fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Córdoba.

Extractos musculares

Sesenta ratas fueron empleadas para obtener los extractos musculares. La metodología seguida para su obtención ha sido descrita previamente (Jimena *et al.*, 1993). Mientras que para obtener los extractos de músculos normales las ratas no fueron sometidas a ninguna manipulación, para obtener los extractos de músculos denervados, todas las ratas fueron sometidas a la sección transversal completa de ambos nervios ciáticos (de los cuales se extrajeron un segmento de 10 mm de largo). Los músculos sóleo y extensor digitorum longus (EDL) fueron extraídos a los 4 día postdenervación ya que en estudios previos hemos comprobado que los extractos obtenidos en este periodo tienen un mayor efecto (Jimena *et al.*, 1998).

Resumidamente el procedimiento para la obtención de extractos es como sigue (fig. 10):

1. En una superficie fría, y tras eliminar los extremos próximos a las uniones miotendinosas, procedemos a trocear los músculos en pequeños fragmentos.
2. Los fragmentos fueron introducidos en tubos de ensayo, conteniendo 1 ml de tampón buffer fosfato a 4°C por cada músculo y homogeneizados.
3. El homogeneizado obtenido se sometió a centrifugación a 4000 rpm durante 5 minutos.
4. El sobrenadante resultante fue filtrado sucesivamente empleando filtros Millipore® de membrana de 3 y 1.2 µm de poro.

5. El filtrado resultante fue de nuevo centrifugado a 8000 rpm durante 3 minutos. Filtramos sucesivamente el sobrenadante con filtros Millipore® de membrana de 0.8, 0.45 y 0.22 μm de poro.
6. El líquido resultante fue empleado como extracto muscular.

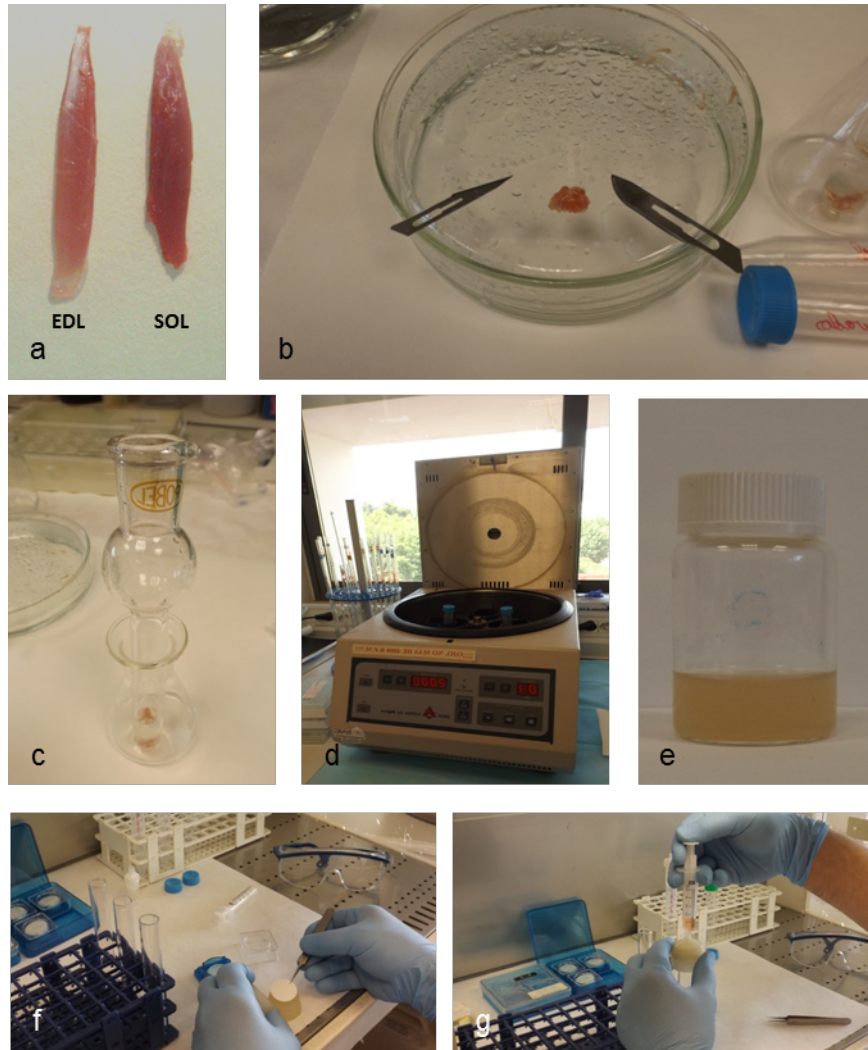


Figura 10. (a) Músculos EDL y sóleo tras su disección. (b) músculo troceado; (c) preparado de músculo y PBS antes de su homogenización. (d) centrifugación. (e) sobrenadante resultante. (f) montaje de filtros en los dispositivos de filtración. (g) filtración.

Primer experimento: ensayo de extractos musculares de distintos músculos en ratas normales.

Veinte de ratas Wistar macho (250-300 g de peso corporal) fueron divididas en cinco grupos: cuatro grupos experimentales y uno control. Cada grupo experimental

(n=4) fue tratado con un tipo de extracto muscular obtenido de músculo sóleo normal (ExSOLn), sóleo denervado (ExSOLd), EDL normal (ExEDLn) y EDL denervado (ExEDLd). En todos los grupos experimentales, las ratas fueron inyectadas intraperitonealmente (1 ml/día durante 10 días consecutivos) con cada tipo de extracto. Como grupo control (n=4) se emplearon ratas normales sin ningún tipo de manipulación.

Segundo experimento: ensayo de extractos de músculo sóleo en ratas con atrofia muscular.

Animales y diseño experimental

Dieciséis Wistar macho (250-300 g de peso corporal) fueron divididas en cuatro grupos de 4 ratas cada uno: grupo control formado por ratas normales (NR), grupo denervado formado por ratas que fueron sometidas a la sección de los nervios ciáticos de ambos miembros posteriores (DR), grupo normal tratadas con extracto de músculo denervado (NR+DmEx) y grupo denervado tratadas con extracto de músculo sóleo denervado (DR+DmEx). En los grupos NR+DmEx y DR+DMEx, las ratas fueron inyectadas intraperitonealmente con 1 ml de extracto durante 10 días consecutivos; en este último grupo, el tratamiento comenzó inmediatamente tras la realización de la denervación.

Sacrificio de los animales y obtención de muestras

Las ratas fueron sacrificadas al finalizar el protocolo experimental; en concreto al día siguiente de la administración de la última dosis de tratamiento. Para ello cada animal fue primero anestesiado con una inyección intraperitoneal de 75 mg/Kg de Ketamina (Imalgene® 100 mg/ml, Merial Laboratorios, Lyon, France) y posteriormente muerta por decapitación. Los músculos sóleo y EDL de ambos miembros posteriores fueron extraídos y de ellos se obtuvo el vientre muscular.

Análisis en microscopía óptica

Los fragmentos destinados para su estudio en microscopía óptica fueron cortados y orientados transversalmente sobre discos de corcho y rápidamente congelados por inmersión en isopentano (2-metil butano) enfriado en nitrógeno líquido

(Dubowitz y Sewry, 2007). Los bloques fueron trasladados a la cámara de un criostato AMES Leica CM1850 UV ® a -20°C donde se mantuvieron durante una hora para que se igualaran las temperaturas. De cada bloque se obtuvieron cortes seriados de 8 µm de grosor, que fueron recogidas en portaobjetos de cristal codificados de forma consecutiva, archivados en cajas de plástico y que fueron almacenadas en un congelador a -20°C hasta la aplicación de las distintas técnicas de tinción.

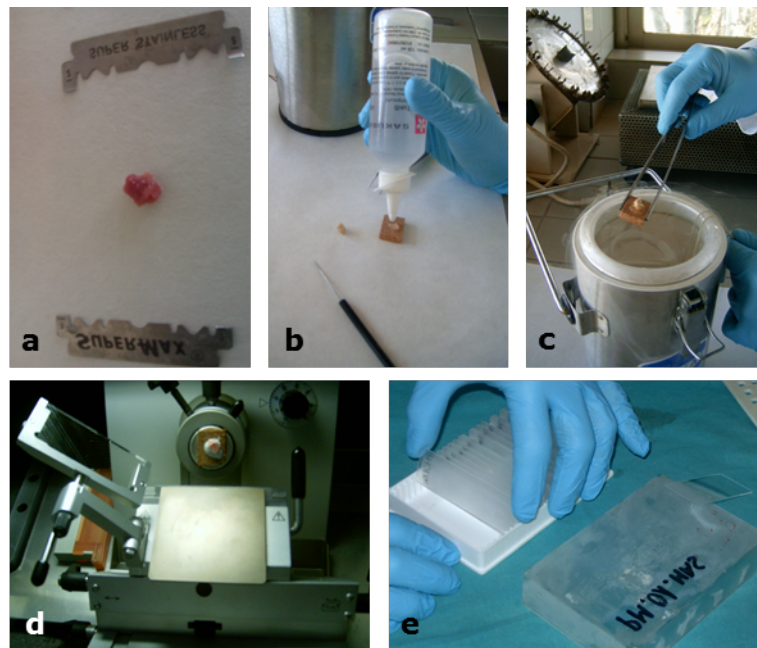


Figura 11. (a) *fragmento muscular.* (b) *montaje en OCT;* (c) *congelación en isopentano enfriado en nitrógeno líquido.* (d) *corte en criostato.* (e) *almacenamiento de cortes seriados.*

Estas técnicas incluyeron:

Técnicas histológicas

- *Hematoxilina-eosina y tricrómico de Gomori modificado* para la evaluación histológica general. Con éstas técnicas realizamos la valoración morfológica general del músculo esquelético: tamaño y contornos de las fibras, cambios en su aspecto tintorial (basofilia/eosinofilia), modificación en la posición de los mionúcleos, organización de los fascículos y del tejido conectivo, infiltrados inflamatorios, fenómenos de necrosis y regeneración, etc.

- *Naranja de acridina* en microscopía de fluorescencia. Con este método podemos identificar el incremento de la concentración de ARN en aquellos casos en los que las fibras muestran un aumento de ribosomas, polirribosomas y retículo endoplásmico rugoso como es el caso de las fibras musculares regenerativas, neoformadas o fibras que sufren hipertrofia.

Técnicas histoquímicas

- *Nicotinamida adenina dinucleotido-tetrazolium reductase* (NADHtr). El lugar de la reacción enzimática incluye mitocondrias, retículo sarcoplásmico, túbulos t y posiblemente otras organelas membranosas. Aunque es poco específica, esta reacción histoquímica es útil para: (1) demostración de cambios citoarquitecturales en las fibras musculares; (2) distinción de fibras tipo 1, 2a y 2b; (3) reconocimiento de concentraciones densas de actividad enzimática oxidativa y pérdida de actividad en fibras degenerativas y necróticas.
- *Adenosina trifosfatasa miofibrilar* (ATPasa, pH 9.4). Esta técnica permite identificar el material miofibrilar poniendo de manifiesto los diferentes tipos de fibras musculares (tipo I o claras y tipo II oscuras). También permite el reconocimiento de determinadas anormalidades citoarquitecturales.

Técnicas inmunohistoquímicas

- *Desmina* (1:50, Desmin, DE-R-11, Dako, Denmark). El anticuerpo antidesmina se emplea como marcador para detectar *in vivo* precursores de células musculares activados en fases tempranas (Lawson-Smith y McGeachie, 1998; Rantanen et al, 1995). Sobre la base de la positividad para desmina se consideró que las células satélites habían sido activadas: las células satélites no se han activado sobre la base de su negatividad a desmina (Hurme y Kalimo, 1992) mientras que las células satélites activadas pueden ser reconocidas en microscopía óptica mediante inmunomarcaje con esta proteína (Komulainen *et al*, 2000).

- *Antígeno de diferenciación miogénica Myo-D* (1:50, Dako) para el marcaje de células satélites activadas (Yoshimura y Harii, 1999)
- *Antígeno nuclear de proliferación celular PCNA* (proliferating cell nuclear antigen) (1:100; Dako), un marcador de células en división (Johnson y Allen, 1993; Lawson-Smith y McGeachie, 1998).

El producto de reacción fue visualizado con el método biotin-avidin-peroxidasas (Dako). Los controles negativos se realizaron de forma paralela sin anticuerpos primarios.

Análisis histomorfométrico

Para el análisis cuantitativo en microscopía de luz, las secciones fueron fotografiadas con un microscopio Nikon Eclipse E1000 (Nikon, Tokyo, Japan) que incorpora una cámara Sony DXC-990P Exwaved HAD y transferidas a un ordenador equipado con el programa de análisis de imagen Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Bethesda, MA, USA).

En cada músculo fueron fotografiadas cinco áreas ($157500 \mu\text{m}^2$) al azar a unos aumentos de 200x para la medición de los parámetros de tamaño de las fibras musculares (*área transversal de la fibra y diámetro menor*) y el *número de fibras/área*. La tinción ATPasa miofibrilar a pH 9.4 fue utilizada para medir el tamaño de las fibras tipo 1 y 2 en el músculo sóleo y la tinción NADH-tr para medir el tamaño de las fibras tipo 1, 2a y 2b en el músculo EDL.

Para evaluar la *respuesta miogénica*, se fotografiaron en cada sección transversal cinco áreas a unos aumentos de 200x,

- en secciones teñidas con antidesmina fueron contabilizadas: el número de perfiles desmina+ (número células satélites activadas), células mononucleadas desmina+ y pequeñas fibras musculares desmina+.
- en secciones teñidas con MyoD: número de núcleos MyoD+ por área
- en secciones teñidas con PCNA, número de núcleos PCNA+ por área.

Todas las mediciones y cuantificaciones fueron realizadas por dos evaluadores independientes ciegos para la identificación de las muestras y al menos fueron evaluadas 300 fibras por músculo (2400 fibras/grupo).

Análisis en microscopía electrónica de transmisión

Se realizó la observación y estudio de las distintas muestras valorando los rasgos ultraestructurales de las fibras musculares, células satélites y diferentes elementos ubicados en el espacio endomisial.

De cada uno de los músculos se tomaron pequeños fragmentos que fueron fijados durante 24 horas en glutaraldehído a 2.5% en tampón fosfato a pH 7.4. A continuación los fragmentos fueron lavados en tampón y posfijados con OsO₄ al 1% (fig. 12). Tras la deshidratación con acetonas, los fragmentos fueron incluidos en araldite, siguiendo protocolos estandarizados (Cumming *et al*, 1994; Dubowitz y Swery, 2007). En un ultramicrotomo LKB 8800 se obtuvieron secciones ultrafinas (30-40 nm), recogidas en rejillas de cobre y teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo.

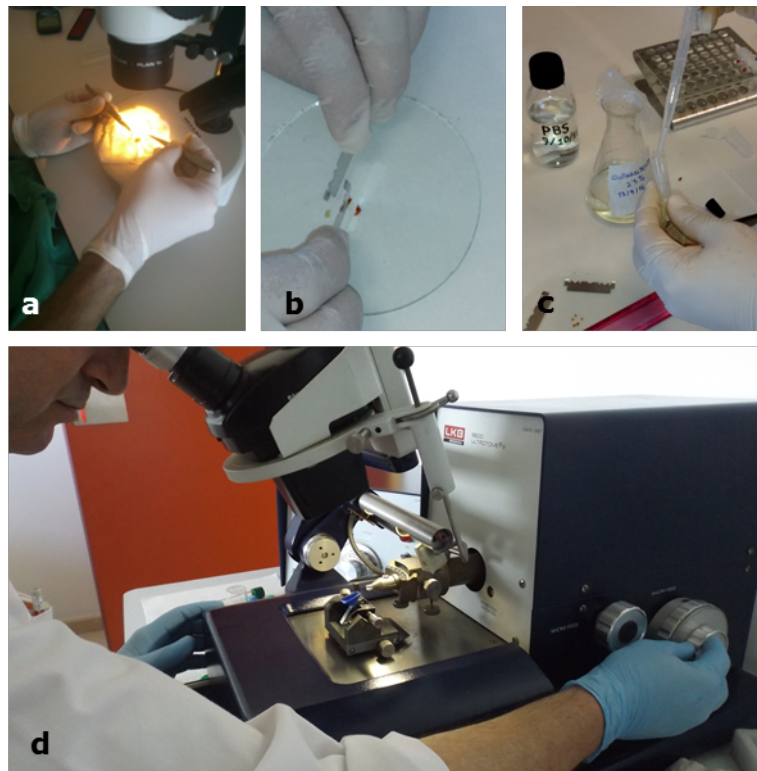


Figura 12. (a) comprobación de la orientación de la muestra. (b) obtención de los fragmentos musculares; c) fijación en glutaraldehído. (d) corte en ultramicrotomo.

Observación y estudio ultraestructural

La observación se llevó a cabo con los microscopios electrónicos de transmisión Philips CM10 y JEM 1400 de alta resolución en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI, Universidad de Córdoba, España). Empleando aumentos entre 4000-12,500 x, se procedió al análisis de la población de mionúcleos y células satélites. Con objeto de no cometer errores, cada micrografía fue comprobada para confirmar la posición característica de las células satélites: entre la membrana plasmática y la lámina basal de la fibra muscular.

Estudio cuantitativo y morfométrico de la población de células satélites

En microscopía electrónica las células satélites fueron identificadas y fotografiadas con el microscopio electrónico a unos aumentos que oscilaron entre 4000 y 6000x. Los criterios de selección fueron: i. núcleo con alto contenido en heterocromatina y ii. su posición entre la membrana basal y la membrana plasmática de la fibra muscular.

El porcentaje de células satélites fue determinado contando el número de células satélites y de mionúcleos y dividiendo el número de núcleos de células satélites por el número total de núcleos (núcleos de células satélites + mionúcleos). Esta metodología sigue siendo la más segura para analizar la población de este tipo celular (Heimann *et al*, 1996). Los valores de cinco cortes por músculo fueron analizados y calculado un porcentaje medio de células satélites por músculo.

Una vez identificadas y cuantificadas se obtuvieron los siguientes parámetros morfométricos: área de la célula (μm^2), área del núcleo (μm^2) y porcentaje de células satélites activadas. Se consideró como célula satélite activada a aquella cuya relación área del núcleo/área de la célula fuese mayor que la cuantificada para la población de células satélites del grupo de ratas normales.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se empleó el programa SigmaStat 3.1 (Systat Software Inc., Point Richmond, CA, USA). Las diferencias fueron consideradas significativas para $p < 0,05$.

En el primer experimento, los datos se presentaron como media \pm desviación estándar (DS) de la media de las 40 áreas analizadas abarcando los dos músculos de todos los animales en cada grupo. Se empleó el análisis de la varianza ANOVA seguida del método Hold-Sidak si se cumplía el test de normalidad o el test de Dunn si no se cumplía el test de normalidad.

En el segundo experimento, los datos fueron expresados como la media \pm el error estándar (ES) de las cuatro ratas de cada grupo. Se empleó el análisis de la varianza ANOVA. En aquellas muestras que pasaron el test de normalidad se realizó la prueba de Student-Newmann-Keuls y en el resto utilizamos el test de Dunn.

Resultados

55

Análisis de la respuesta de los músculos sóleo y EDL a los diferentes tipos de extractos.....	57
Efectos de los extractos derivados de músculos sóleo.....	57
Cambios histomorfométricos	
Efectos sobre la respuesta miogénica	
Efectos de los extractos derivados de músculos EDL.....	63
Cambios histomorfométricos	
Efectos sobre la respuesta miogénica	
Análisis de la activación de las células satélites por extracto de músculo denervado en la atrofia muscular por denervación.....	66
Evaluación de la respuesta miogénica en microscopía óptica	
Evaluación de la respuesta miogénica en microscopía electrónica	

Análisis de la respuesta de los músculos sóleo y EDL a los diferentes tipos de extractos

En el grupo control tanto en los músculos sóleo como EDL de ratas normales la organización y estructura de las fibras musculares fueron completamente normales, destacando bastante homogeneidad en el tamaño de las fibras para el músculo sóleo, mientras que para los músculos EDL había diferencias de tamaño entre tipos de fibras en todos los casos las fibras musculares mostraban contornos poligonales y núcleos en posición periférica (fig. 13). A nivel ultraestructural las fibras musculares no mostraron ningún tipo de cambio y se encontraron esporádicamente células satélites en reposo.

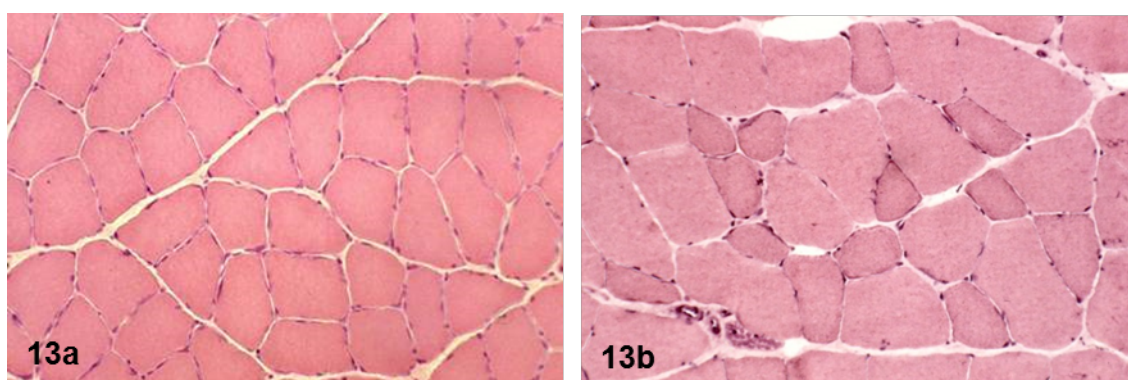


Figura 13. Grupo control. Histología normal del músculo sóleo (a) y EDL (b). H & E. 20 x

Efectos de los extractos derivados de músculos sóleo.

Los extractos obtenidos a partir de músculos sóleo tanto normales como denervados provocaron un efecto miotrófico tanto sobre músculos sóleo como EDL. Como mostró el aumento en el área transversal y diámetro menor y un descenso en el coeficiente número de fibras área, ambos músculos respondieron con una hipertrofia de las fibras musculares ya que hubo diferencias significativas para todos estos parámetros con respecto al control (tablas 1 y 2) y una respuesta miogénica consistente en la neoformación de fibras musculares y la activación y diferenciación miogénica tanto de células satélites como de células ubicadas en el espacio intersticial como reveló la tinción con antidesmina y el análisis cuantitativo (tablas 3 y 4). Sin embargo, esta respuesta fue generalmente mayor cuando se emplea extracto de músculo sóleo denervado frente a extracto de músculo normal y siempre mayor para el músculo sóleo que para el músculo EDL.

Tabla 1. Efectos de extractos derivados de músculos sóleo: cambios histomorfométricos en sóleo.

	<u>atf tipo I</u> (μm^2)	<u>atf tipo II</u> (μm^2)	<u>dm tipo I</u> (μm)	<u>dm tipo II</u> (μm)	<u>fibras/área</u>
SOL control	2744.60 \pm 606.73	2498.43 \pm 259.34	45.17 \pm 6.25	41.73 \pm 2.73	63.70 \pm 6.68
Ex-SOL-n	3617.73 \pm 1059.49 <i>a</i>	3176.17 \pm 572.48 <i>a</i>	50.33 \pm 9.10 <i>a</i>	50.92 \pm 6.52 <i>a</i>	50.40 \pm 7.01 <i>a</i>
Ex-SOL-d	4024.52 \pm 983.62 <i>a, b</i>	3681.21 \pm 589.86 <i>a, b</i>	53.06 \pm 6.45 <i>a, b</i>	53.38 \pm 6.25 <i>a</i>	44.82 \pm 3.81 <i>a, b</i>

atf: área transversal de la fibra; dm: diámetro menor; fibras/área: número de fibras por área..
Los valores representan la media \pm desviación estándar. *a*: diferencias significativas vs control ($P < 0.05$); *b*: diferencias significativas vs Ex-SOL-d ($P < 0.05$).

Tabla 2. Efectos de extractos derivados de músculos sóleo: cambios histomorfométricos en EDL

	<u>atf tipo I</u> (μm^2)	<u>atf tipo IIa</u> (μm^2)	<u>atf tipo IIb</u> (μm^2)	<u>dm tipo I</u> (μm)	<u>dm tipo IIa</u> (μm)	<u>dm tipo IIb</u> (μm)	<u>fibras/área</u>
EDL control	1100.56 \pm 185.77	1973.51 \pm 330.58	3425.97 \pm 484.57	28.41 \pm 3.77	38.52 \pm 6.15	52.99 \pm 5.47	69.20 \pm 5.76
ex-SOL-n	1469.03 \pm 242.08 <i>a</i>	2499.94 \pm 385.62 <i>a</i>	4107.26 \pm 758.72 <i>a</i>	33.86 \pm 4.42 <i>a</i>	44.26 \pm 4.26 <i>a</i>	58.26 \pm 8.07 <i>a</i>	60.04 \pm 3.00 <i>a</i>
ex-SOL-d	1396.22 \pm 230.90 <i>a</i>	2321.07 \pm 288.12 <i>a</i>	3771.51 \pm 316.74 <i>a, b</i>	31.72 \pm 4.17 <i>a</i>	43.19 \pm 2.59 <i>a</i>	55.51 \pm 4.69 <i>a, b</i>	61.00 \pm 2.34 <i>a</i>

atf: área transversal de la fibra; dm: diámetro menor; fibras/área: número de fibras por área. Los valores representan la media \pm desviación estándar. *a*: diferencias significativas vs control ($P < 0.05$); *b*: diferencias significativas vs Ex-SOL-n ($P < 0.05$).

Los cambios histológicos fueron comunes para ambos tipos de músculos, pero siempre fueron más llamativos en el músculo sóleo. Con H-E las fibras musculares eran de aspecto aparentemente normal a excepción de un evidente mayor número de núcleos. En algunos casos algunos de ellos se encontraron rodeados por un halo basófilo citoplasmático haciendo protusión sobre la fibra muscular, lo que fue muy sugestivo de que se tratasen de células satélites activadas (fig. 14). Entre las fibras musculares se pudieron encontrar pequeñas fibras de mayor o menor basofilia, que generalmente solían ocupar los bordes de los fascículos musculares. Con la tinción AO las fibras mostraban la periferia con intensa fluorescencia anaranjada y también eran evidentes un mayor número de núcleos (fig. 15); las fibras pequeñas mostraban igualmente una intensa fluorescencia anaranjada. No fueron observados cambios citoarquitecturales con las técnicas histoquímicas, ni en el porcentaje de tipos de fibras (figs. 16 y 17).

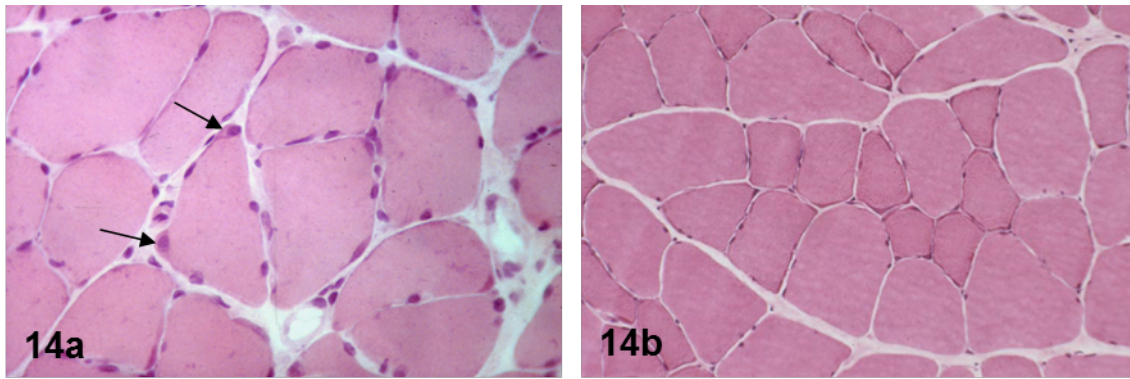


Figura 14. Grupo ExSOLd. (a) Músculo sóleo. Las fibras musculares son grandes y muestran un aparente número de núcleos; algunos de ellos son grandes, tienen morfología redondeada y están rodeados por un anillo basófilo (flechas). (b) músculo EDL. Las fibras musculares se encuentran incrementadas en tamaño sin aparente cambios en los núcleos. H & E, 40 x

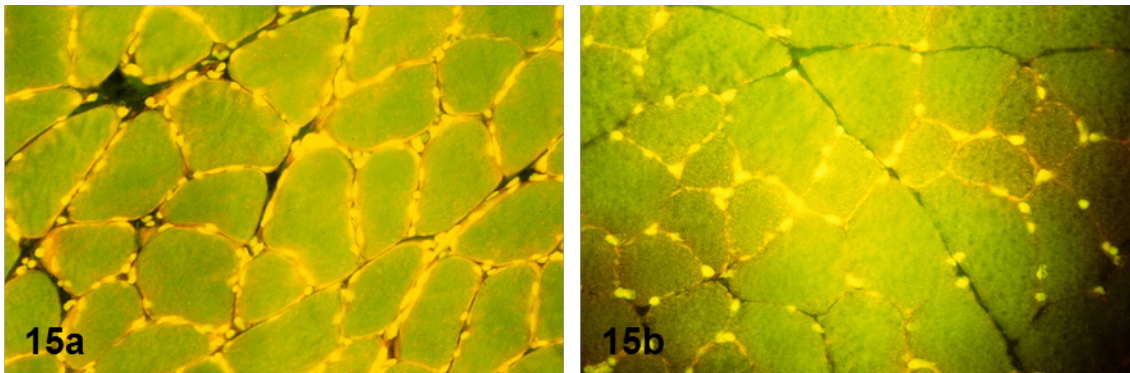


Figure 15. Grupo ExSOLd. (a) Músculo sóleo. Las fibras musculares muestran fluorescencia anaranjada en la periferia con un evidente incremento en el número de mionúcleos (fluorescencia amarilla). (b) Músculo EDL. Notesé que el incremento de la fluorescencia anaranjada y el número de núcleos es menor en comparación con el músculo sóleo. Naranja de acridina, 40 x.

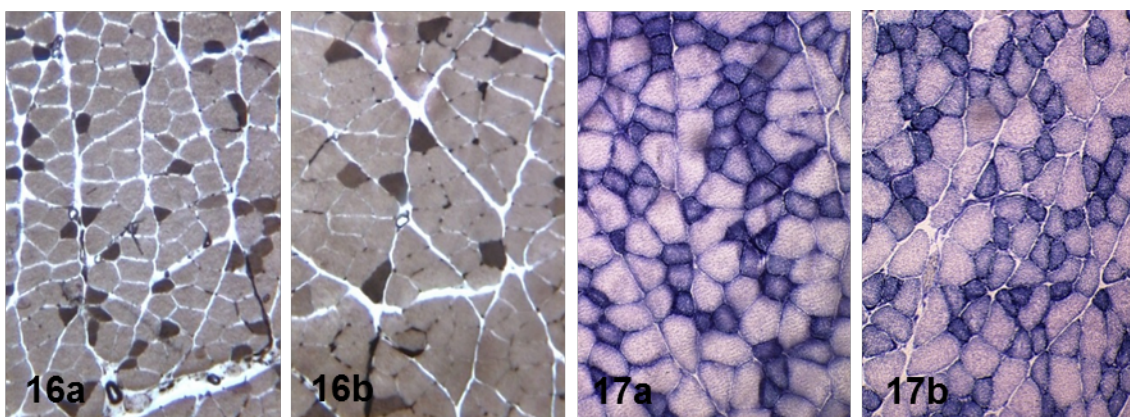


Figura 16. (a) Grupo control. Músculo sóleo. Sección transversal teñida con ATPasa a pH 9.6 mostrando las fibras tipo 1 (claras) y tipo 2 (oscuras). (b) Grupo ExSOLd. Músculo sóleo. En comparación con la imagen anterior, las fibras musculares son más grandes y aparentemente no hay cambios en los tipos de fibras. 10 x.

Figura 17. (a) Grupo control. Músculo EDL. Los diferentes tipos de fibras pueden ser identificados por su tinción histoquímica con NADH-tr: fibras tipo 1 (alta actividad oxidativa) aparecen oscuras, las tipo 2b (baja actividad oxidativa) aparecen claras y las tipo 2a aparecen de tinción intermedia. (b) Grupo ExSOLd. músculo EDL. El tamaño y proporción de fibras son aparentemente muy similares con la imagen precedente. 10 x.

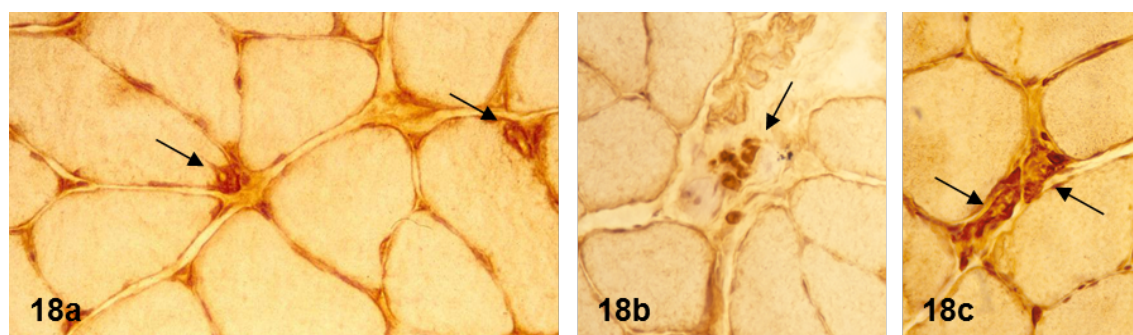


Figure 18. Grupo ExSOLd. (a) Músculo sóleo. Las flechas señalan: (a) incrementos periféricos en el inmunomarcaje con desmina en las fibras musculares; se corresponden muy probablemente con células satélite activadas. (b) un grupo de células desmina+ localizado en perimysio y (c) dos pequeñas fibras musculares desmina+. 40 x.

Tabla 3. Efectos de extractos derivados de músculos sóleo: respuesta miogénica en músculo sóleo

	Núcleos/ fibra	SC desmina+	CI desmina+	FP desmina+
SOL control	1.54 ± 0.14	0.16 ± 0.06	0.16 ± 0.10	0.23 ± 0.09
Ex-SOL-n	2.88 ± 0.27 <i>a</i>	3.29 ± 0.40 <i>a</i>	1.12 ± 0.30 <i>a</i>	0.91 ± 0.15 <i>a</i>
Ex-SOL-d	2.99 ± 0.20 <i>a</i>	3.56 ± 0.37 <i>a</i>	1.90 ± 0.45 <i>a, b</i>	1.20 ± 0.26 <i>a</i>

Núcleos/fibra: número de núcleos/fibra; SC desmina+: células satélite marcadas con desmina; CI desmina+: células intersticiales marcadas con desmina; PF desmina+: fibras de pequeño tamaño marcadas con desmina. Los valores representan la media ± desviación estándar.
a: diferencias significativas vs control ($P < 0.05$); *b*: diferencias significativas vs Ex-SOL-n ($P < 0.05$).

Table 4. Efectos de extractos derivados de músculos sóleo: respuesta miogénica en músculos EDL

	Núcleos/ fibra	SC desmina+	CI desmina+	FP desmina+
EDL control	1.58 ± 0.14	0.20 ± 0.07	0.13 ± 0.07	0.10 ± 0.05
Ex-SOL-n	2.11 ± 0.15 <i>a</i>	0.72 ± 0.11 <i>a</i>	0.32 ± 0.10 <i>a</i>	0.59 ± 0.09 <i>a</i>
Ex-SOL-d	2.38 ± 0.29 <i>a</i>	0.82 ± 0.17 <i>a</i>	0.35 ± 0.11 <i>a</i>	0.42 ± 0.18 <i>a</i>

Núcleos/fibra: número de núcleos/fibra; SC desmina+: células satélite marcadas con desmina; CI desmina+: células intersticiales marcadas con desmina; PF desmina+: fibras de pequeño tamaño marcadas con desmina. Los valores representan la media ± desviación estándar.
a: diferencias significativas vs control ($P < 0.05$); *b*: diferencias significativas vs Ex-SOL-n ($P < 0.05$).

La tinción inmunohistoquímica con desmina reveló la presencia de perfiles periféricos desmina + sugestivos de células satélites activadas, células mononucleadas desmina + aisladas o agrupadas en el espacio intersticial y también fibras pequeñas desmina + (fig. 18) (tabla 3). Estas últimas mostraban basofilia con H-E y fluorescencia naranja con la tinción AO.

El análisis con microscopía electrónica confirmó las observaciones en microscopía de luz. Muchas fibras musculares mostraron que el espacio subsarcolémico estaba agrandado y ocupado por abundantes ribosomas. La organización miofibrilar estaba preservada a excepción de algunas pequeñas zonas de disrupción miofibrilar. También se encontraron células satélites activadas que estaban en buena relación con lo observado en microscopía de luz, ya que hacían protusión sobre la superficie de la fibra muscular y mostraban un mayor citoplasma con mitocondrias y abundantes ribosomas (fig. 19). No hubo evidencias morfológicas de que estas células atravesaran la lámina basal.

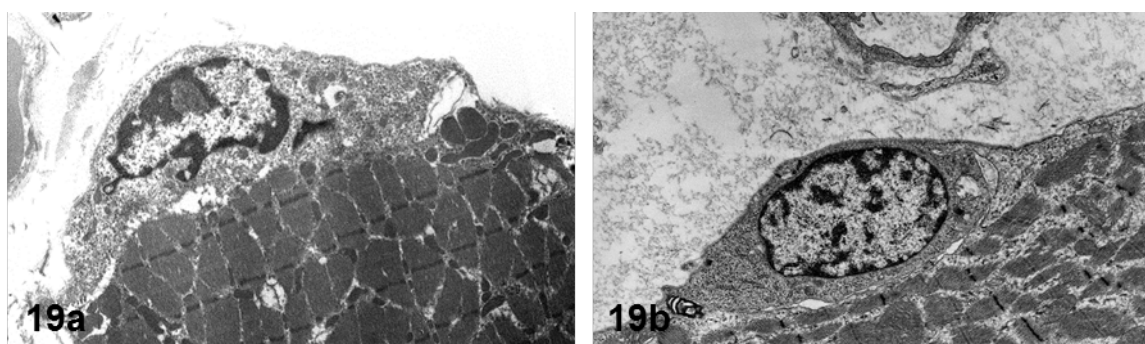


Figure 19. Grupo ExSOLd. (a) Músculo sóleo. Célula satélite activada con un gran citoplasma, hace protusión en la superficie de la fibra muscular. 5200x (b) Músculo EDL. Célula satélite con moderada activación. 3900 x.

En la vecindad de las fibras musculares, fueron encontradas células mononucleadas similares a células satélites, aunque completamente rodeadas por una lámina basal (fig. 20a); algunas de ellas tenían un citoplasma más desarrollado que contenía organelas (Fig. 21b). Es destacable que muchos pericitos mostraron un citoplasma desarrollado y se encontraron bastante separados de la pared capilar (fig. 20c). También encontramos, junto a capilares, pequeñas fibras musculares con rasgos

ultraestructurales de neoformación: núcleo eucromático, ribosomas, mitocondrias y miofibrillas incipientes (Fig. 21).

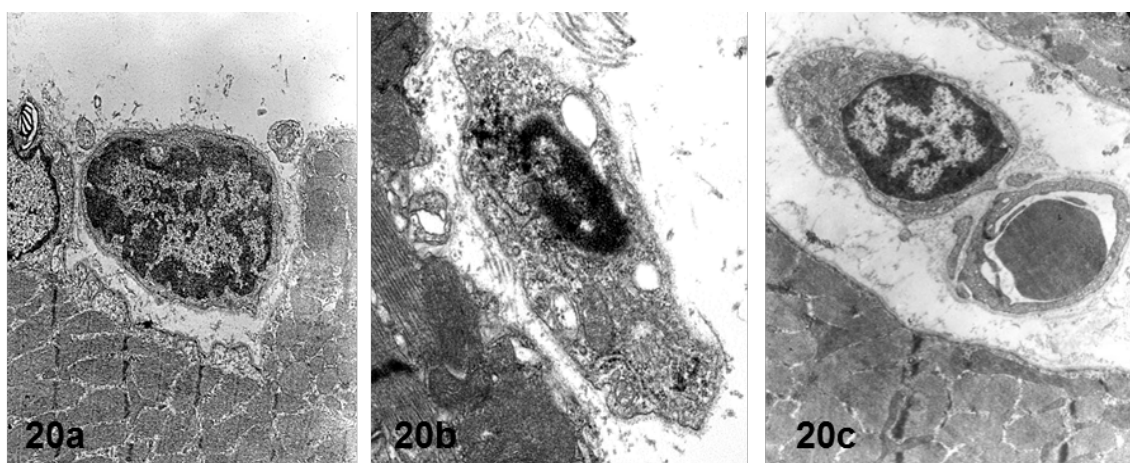


Figure 20. Grupo ExSOLd. (a) Músculo sóleo. Célula mononuclear con escaso citoplasma y completamente rodeada por una lámina basal, 6610 x. (b) Músculo EDL. . Célula mononuclear rodeada por una lámina basal y con abundante citoplasma conteniendo ribosomas, mitocondrias y retículo endoplásmico rugoso, 6610 x. (c) Célula mononuclear rodeada por lámina basal y próxima a un capilar, lo que sugiere que se trate de un pericito; contiene también abundante citoplasma con ribosomas, mitocondrias y retículo endoplásmico rugoso. 6610 x.

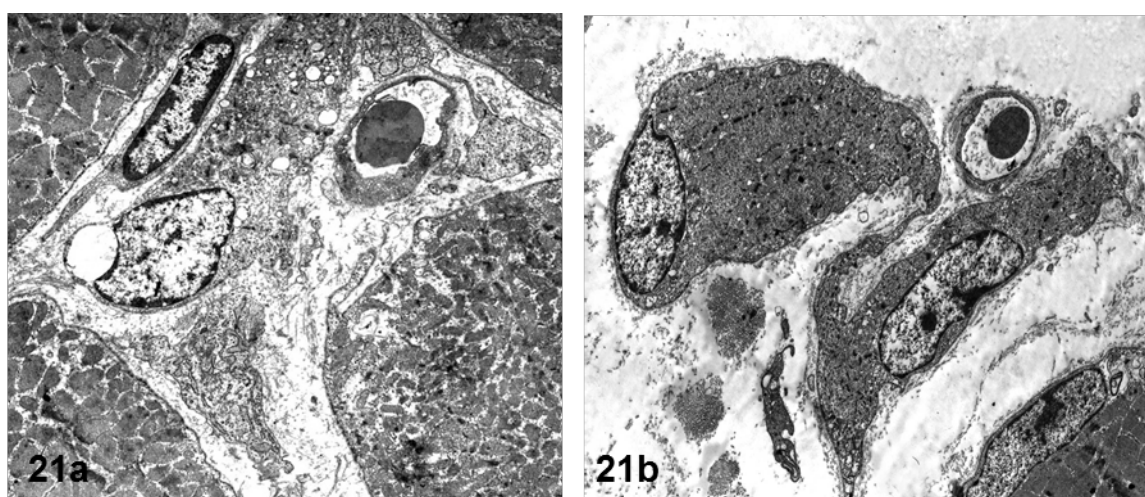


Figura 21. Grupo ExSOLd. Músculo sóleo. (a) (b). Imágenes representativas de pequeñas fibras localizadas en la vecindad capilar. Estas fibras contienen miofibrillas incipientes y núcleos eucromáticos. 2950 x.

Efectos de los extractos derivados de músculo EDL.

Cuando se emplean extractos de músculo EDL los músculos sóleo y EDL responden de forma diferente. Así, mientras que el músculo sóleo experimenta una hipertrofia de las fibras tipo I y una respuesta miogénica (aunque un menor que con los extractos anteriores) cuando el tratamiento se realiza con n-EDL-ex, no sufre cambios cuando el tratamiento se lleva a cabo con d-EDL-ex (tablas 5 -8). No obstante sí parece existir una atrofia de todos los tipos de fibras del músculo soleo al comparar los efectos del d-EDL-ex con los del n-EDL-ex (tabla 5). A diferencia de esto los músculos EDL respondieron a ambos extractos con una atrofia para las fibras tipo IIa y IIb, pero no para las fibras tipo I (tabla 6). Los extractos derivados del EDL no provocaron ninguna respuesta miogénica en los músculos EDL (tablas 7 y 8).

Tabla 5. Efectos de los extractos derivados de músculos EDL: cambios histomorfométricos en músculos sóleo.

	atf tipo I (μm^2)	atf tipo II (μm^2)	dm tipo I (μm)	dm tipo II (μm)	fibras/área
SOL control	2744.60 \pm 606.73	2498.43 \pm 259.34	45.17 \pm 6.25	41.73 \pm 2.73	63.70 \pm 6.68
Ex-EDL-n	3577.53 \pm 776.59 <i>a</i>	2833.66 \pm 538.75	50.28 \pm 8.71 <i>a</i>	44.00 \pm 6.42	49.26 \pm 3.99 <i>a</i>
Ex-EDL-d	2856.06 \pm 1195.61 <i>b</i>	1766.66 \pm 375.67 <i>a, b</i>	45.70 \pm 10.95 <i>b</i>	35.55 \pm 5.73 <i>a, b</i>	61.56 \pm 4.38 <i>b</i>

atf: área transversal de la fibra; dm: diámetro menor; fibras/área: número de fibras por área. Los valores representan la media \pm desviación estándar. *a*: diferencias significativas vs control ($P < 0.05$); *b*: diferencias significativas vs Ex-EDL-n ($P < 0.05$).

Tabla 6. Efectos de los extractos derivados de músculos EDL: cambios histomorfométricos en músculos EDL

	atf tipo I (μm^2)	atf tipo IIa (μm^2)	atf tipo IIb (μm^2)	dm tipo I (μm)	dm tipo IIa (μm)	dm tipo IIb (μm)	fibras/área
EDL control	1100.56 \pm 185.77	1973.51 \pm 330.58	3425.97 \pm 484.57	28.41 \pm 3.77	38.52 \pm 6.15	52.99 \pm 5.47	69.20 \pm 5.76
Ex-EDL-n	1031.59 \pm 211.96	1740.57 \pm 355.37 <i>a</i>	2526.59 \pm 367.55 <i>a</i>	28.49 \pm 4.09	35.02 \pm 3.51 <i>a</i>	45.86 \pm 4.34 <i>a</i>	93.40 \pm 3.05 <i>a</i>
Ex-EDL-d	995.67 \pm 311.84 <i>b</i>	1701.48 \pm 232.08 <i>a, b</i>	2647.60 \pm 370.78 <i>a, b</i>	27.26 \pm 4.64 <i>b</i>	35.90 \pm 4.25 <i>a, b</i>	45.80 \pm 5.86 <i>a, b</i>	92.20 \pm 7.15 <i>a, b</i>

atf: área transversal de la fibra; dm: diámetro menor; fibras/área: número de fibras por área. Los valores representan la media \pm desviación estándar. *a*: diferencias significativas vs control ($P < 0.05$); *b*: diferencias significativas vs Ex-EDL-n ($P < 0.05$).

La disminución en tamaño pareció afectar a todo el conjunto de las fibras ya que no se vieron zonas de variabilidad de tamaño y las fibras mostraban un perfil redondeado y no se vieron fibras atróficas anguladas. Sin embargo, si fue evidente con la tinción NADH-tr una alteración del patrón tintorial consistente en la presencia de zonas carentes de actividad enzimática que confieren a las fibras un aspecto *moth-eaten* (fig. 22). Ultraestructuralmente en algunas fibras se encontraron distorsión del patrón miofibrilar (fig. 23), y algunos núcleos picnóticos.

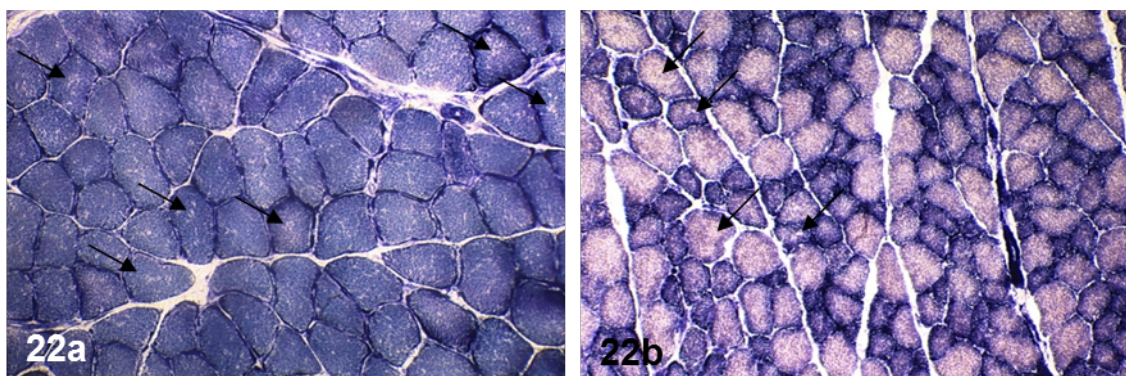


Figura 22. Grupo ExEDLd. (a) Músculo sóleo. Las fibras musculares son aparentemente normales, aunque algunas de ellas presentan pequeñas áreas con pérdida de actividad oxidativa (flechas). (b) Músculo EDL. Si se compara con la figura 17a, se puede comprobar como las fibras son más pequeñas y algunas muestran áreas de ausencia irregular de actividad enzimática oxidativa (flechas). NADH-tr, 10x

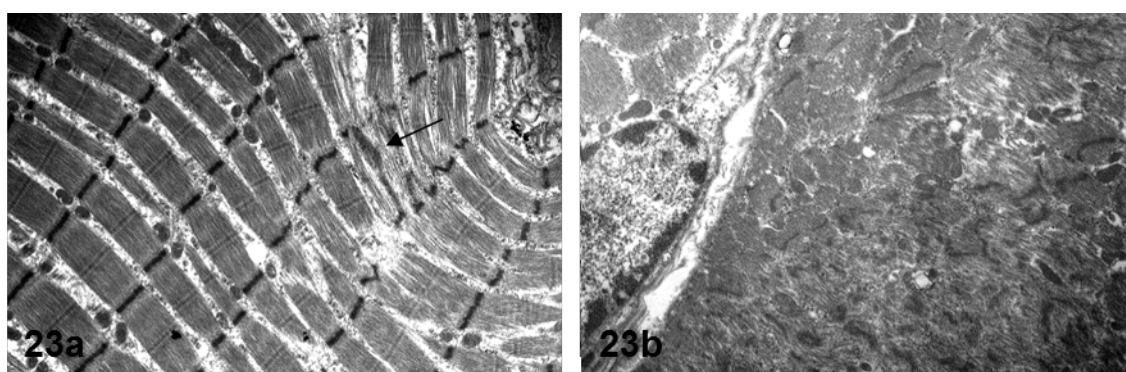


Figura 23. Grupo ExEDLd. (a) Músculo sóleo. Pequeña área con rotura de miofibrilla (flechas). 5000 x. (b) Músculo EDL. Importante desintegración de miofibrillas y líneas Z, 5000 x.

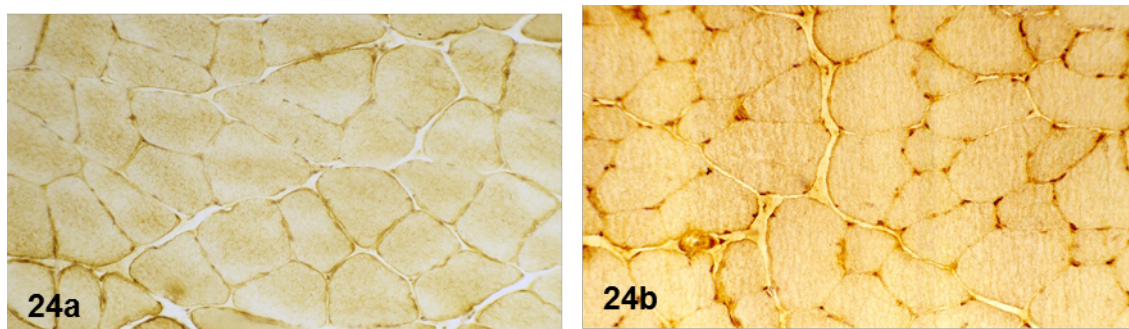


Figura 24. Grupo ExEDLd. La inmunotinción con desmina no revela cambios en los músculos (a) sóleo y (b) EDL. 40 x.

La inmunotinción con desmina no reveló hallazgos sugestivos de respuesta miogénica (Fig. 24). Las células satélite se mostraban inactivas (Fig. 25) y no se observaron células mononucleadas rodeadas de membrana basal similares a las vistas en los músculos de animales tratados con extractos de músculo sóleo y EDL normales

Tabla 7. Efectos de los extractos derivados de músculos EDL: respuesta miogénica en músculos sóleo

	Núcleos/ fibra	SC desmina+	CI desmina+	FP desmina+
SOL control	1.54 ± 0.14	0.16±0.06	0.16±0.10	0.23±0.09
Ex-EDL-n	2.02 ± 0.38 <i>a</i>	3.27 ± 0.51 <i>a</i>	1.24 ± 0.40 <i>a</i>	0.78 ± 0.21 <i>a</i>
Ex-EDL-d	1.52 ± 0.15 <i>b</i>	0.17 ± 0.08 <i>b</i>	0.18 ± 0.09 <i>b</i>	0.21 ± 0.10 <i>b</i>

Núcleos/fibra: número de núcleos/fibra; SC desmina+: células satélite marcadas con desmina; CI desmina+: células intersticiales marcadas con desmina; PF desmina+: fibras de pequeño tamaño marcadas con desmina. Los valores representan la media ± desviación estándar.
a: diferencias significativas vs control ($P < 0.05$); *b*: diferencias significativas vs Ex-EDL-n ($P < 0.05$).

Tabla 8. Efectos de los extractos derivados de músculos EDL: respuesta miogénica en músculos EDL

	Núcleos/ fibra	SC desmina+	CI desmina+	FP desmina+
EDL control	1.58 ± 0.14	0.20 ± 0.07	0.13 ± 0.07	0.10 ± 0.05
Ex-EDL-n	1.53 ± 0.16	0.24 ± 0.09	0.11 ± 0.06	0.12 ± 0.04
Ex-EDL-d	1.49 ± 0.18 <i>b</i>	0.21 ± 0.13 <i>b</i>	0.14 ± 0.11 <i>b</i>	0.11 ± 0.06 <i>b</i>

Núcleos/fibra: número de núcleos/fibra; SC desmina+: células satélites marcadas con desmina; CI desmina+: células intersticiales marcadas con desmina; PF desmina+: fibras de pequeño tamaño marcadas con desmina. Los valores representan la media ± desviación estándar.

a: diferencias significativas vs control ($P < 0.05$); b: diferencias significativas vs Ex-EDL-n ($P < 0.05$).

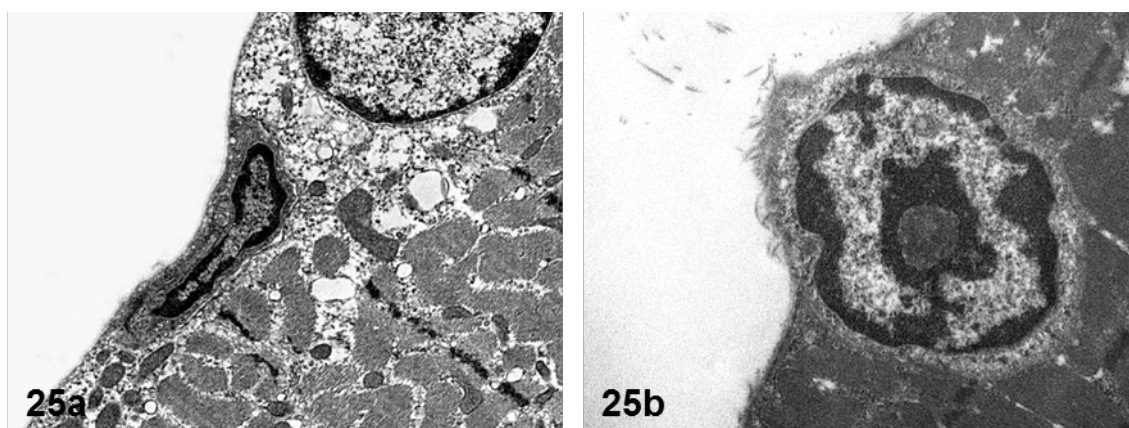


Figura 25. Grupo ExEDLd. Imágenes representativas de células satélites inactivas en los músculos (a) sóleo y (b) EDL. (a) 5200 x, (b) 6610 x

Análisis de la activación de las células satélites por extracto de músculo denervado en la atrofia muscular por denervación

Evaluación de la respuesta miogénica en microscopía óptica

Los músculos del grupo RN mostraron una histología normal y no fueron evidentes cambios importantes en los músculos denervados del grupo RD a excepción de un menor tamaño y perfiles menos redondeados. En comparación con ellos, los grupos RN+ExMd y RD+ExMd sí mostraron cambios histológicos, como el mayor tamaño de las fibras musculares con un aparente incremento en el número de núcleos, más grandes y redondeados, así como la presencia de pequeñas fibras dispersas. Estos cambios fueron también evidentes con la tinción de naranja de acridina (Fig. 26).

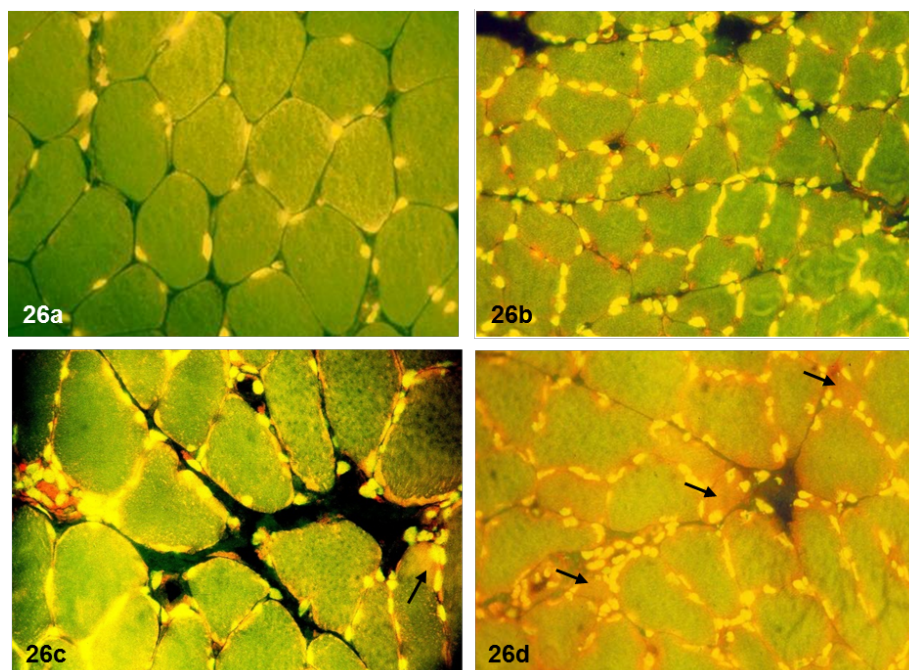


Figura 26. Comparación de secciones transversales de músculos sóleos teñidos con naranja de acridina, correspondientes a los grupos RN (a), DR (b), RN+ExMd (c) y DR+ExMd (d). Los citoplasmas de las fibras musculares normales se tiñen de color verde, mientras que los núcleos exhiben una fluorescencia amarilla. Las fibras musculares con un incremento en la concentración de ARN presentan fluorescencia anaranjada. Observe como existen diferencias en el tamaño de las fibras musculares y en el número de núcleos entre los grupos. Sólo en el grupo de tratamiento con ExMd (d) se observan pequeñas fibras con fluorescencia anaranjada (flechas) siendo sugestivas de neoformación. 40x.

El análisis morfométrico mostró una significativa atrofia ($P < 0.05$) en el grupo RD ($1230.9 \pm 17.7 \mu\text{m}^2$) en comparación con el grupo RN ($2809.2 \pm 18.3 \mu\text{m}^2$), lo que representó una reducción de tamaño del 67%. En los dos grupos de tratamiento con extracto, las fibras musculares incrementaron su área significativamente ($P < 0.05$), llegando a alcanzar un 28% para las ratas del grupo RN+ExMd ($3602.1 \pm 26.7 \mu\text{m}^2$) y de un 59% para las ratas del grupo RD+ExMd ($1967.1 \pm 22.7 \mu\text{m}^2$) en comparación con los grupos RN y RD respectivamente. Por tanto, el efecto miotrófico del extracto de músculo denervado fue mayor sobre el músculo denervado que sobre las fibras musculares normales en base al mayor incremento en el porcentaje,

Mientras que en los músculos del grupo RN no se observó positividad para ninguno de los marcadores inmunohistoquímicos empleados, en los grupos RD, RN+ExMd y RD+ExMd sí fueron detectados. Se observaron núcleos MyoD+ tanto en el intersticio como en las fibras musculares (Fig. 27a), siendo más significativo para los grupos tratados con extracto frente al grupo DR (fig. 28). El número de núcleos PCNA+

fue significativamente mayor en los grupos tratados con extracto y especialmente en el grupo RD+ExMd (fig. 28), pero la mayoría estaban localizados en el intersticio y sólo ocasionalmente fueron vistos en la periferia de las fibras musculares (fig. 27b).

Con la tinción antidesmina se reveló la existencia de perfiles positivos en la periferia de algunas fibras musculares que contenían núcleos (figs. 27c 28) y la presencia, preferentemente en el espacio perimisial, de células mononucleadas y pequeñas fibras musculares desmina+ (fig. 29). Sin embargo, hubo diferencias cuantitativas entre los tres grupos (fig. 30). Las pequeñas fibras se localizaron preferentemente en los bordes de los fascículos musculares e interesantemente algunas se encontraban en estrecha relación con los capilares (Fig. 29b). Muchas de ellas mostraron carácter basófilo, fluorescencia anaranjada con naranja de acridina. Su presencia se limitó a los dos grupos tratados con el extracto, siendo significativamente más frecuentes en el grupo RD+DmEx (fig.30).

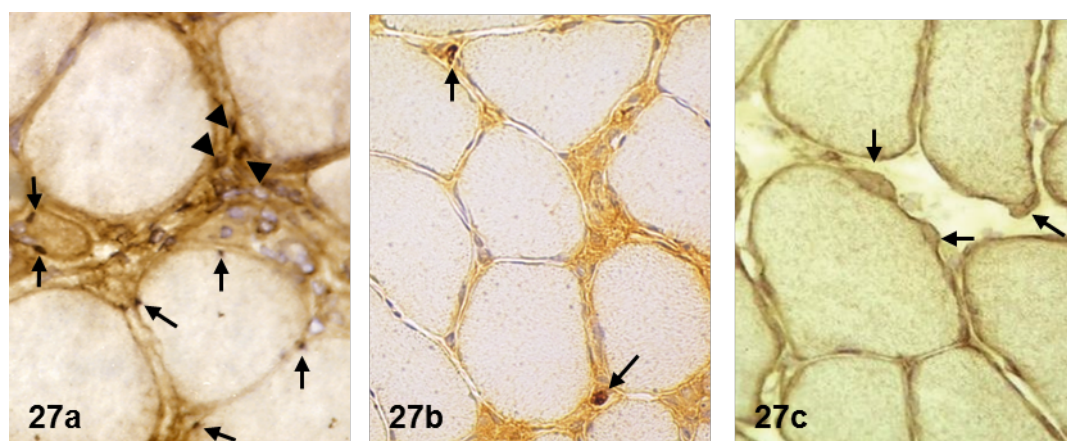


Figura 27. *Inmunohistoquímica de la respuesta miogénica. Secciones transversas de de músculos sóleo teñidos frente a MyoD (a), PCNA (b) y desmina (c) en animales representativos del grupo RD+ExMd. (a) Se observan núcleos marcados con MyoD en la periferia de las fibras musculares (flechas) y dispuestos en grupos en el intersticio (cabezas de flecha). (b) sólo dos núcleos PCNA+ se observan en el intersticio (flechas). (c) Dos fibras musculares presentan en la periferia perfiles desmina+ que hacen protuberancia en la periferia de las fibras musculares sugestivas de células satélites activadas (flechas). 40x a.o.*

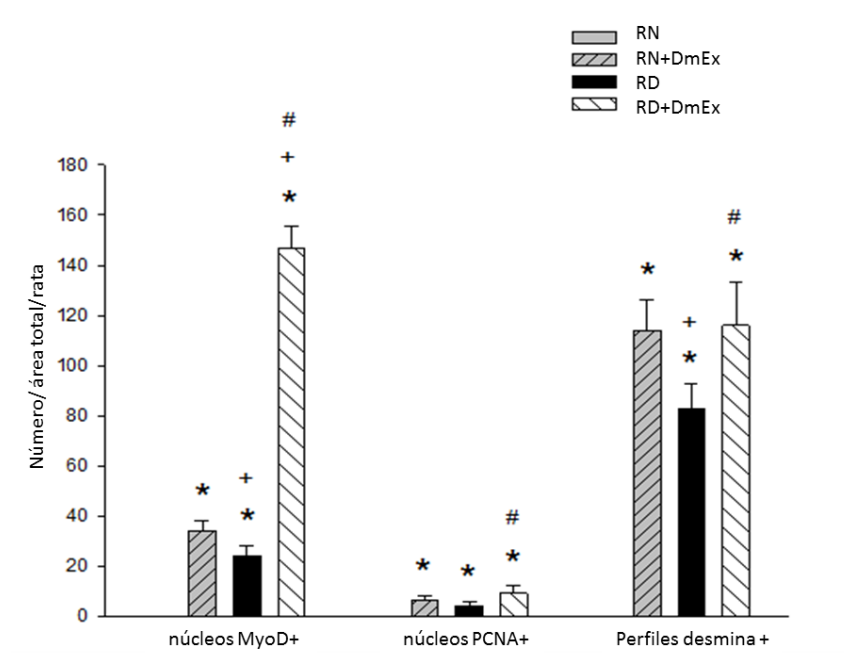


Figura 28. Representación gráfica de los resultados cuantitativos de los núcleos marcados con MyoD y PCNA así como los perfiles desmina+ en los cuatro grupos. * Diferente significativamente con grupo RN; +Diferente significativamente con grupo RN+ExMd; # Diferente significativamente con grupo RD. Los valores representan las medias \pm SD, n = 4 ratas por grupo.

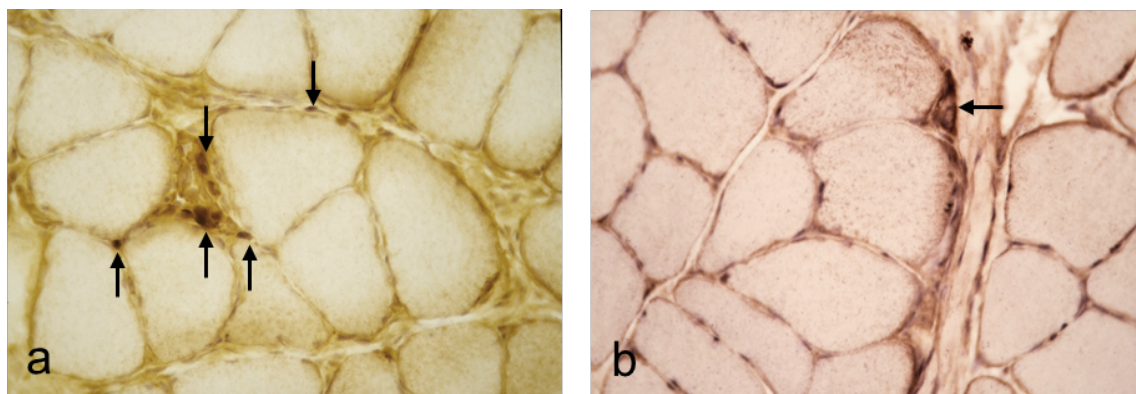


Figura 29. Secciones transversas de músculo sóleo teñido mediante marcaje inmunohistoquímico frente a desmina en animales representativos del grupo los grupos (a) RN+ExMd y (b) RD+ExMd. (a) Las flechas señalan células desmina+ en el perimysio. (b) En el perimysio se aprecia una fibra pequeña perifascicular desmina. 40 x

Es evidente, por tanto, que en el grupo RD, la denervación produjo una respuesta miogénica en el músculo esquelético. En el grupo RN+ExMd ocurrió una respuesta similar, aunque significativamente diferente. Finalmente, la respuesta fue mucho mayor en el grupo RD+ExMd, menos en el número de perfiles desmina positivos no encontrándose diferencias significativas entre estos dos últimos grupos (fig. 28).

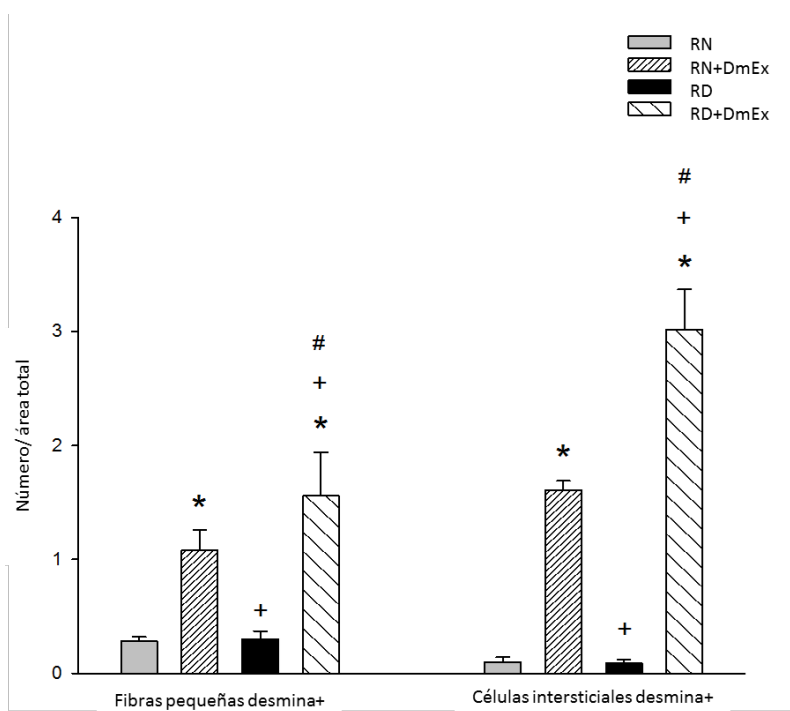


Figura 30. Representación gráfica de los resultados cuantitativos de los núcleos marcados con MyoD y PCNA así como los perfiles desmina+ en los cuatro grupos. * Diferente significativamente con grupo RN; +Diferente significativamente con grupo RN+ExMd; # Diferente significativamente con grupo RD. Los valores representan las medias \pm SD, n = 4 ratas por grupo.

Evaluación de la respuesta miogénica en microscopía electrónica

En el grupo RN todas las células satélites fueron observadas entre la lámina basal y la membrana plasmática de las fibras musculares y en ningún caso mostraron zonas de contacto con la fibra muscular ni tampoco hacían protrusión en la superficie. Todas se encontraban en situación de reposo y se caracterizaban por tener un núcleo heterocromático y un citoplasma escaso (fig. 31a). Las fibras musculares a las que se asociaban mostraban miofibrillas con sarcómeras bien organizadas y la disposición de

las mitocondrias entre las miofibrillas y en localizaciones subsarcolémica era la habitual. El retículo sarcoplásmico, aunque difícil de ver en muchas ocasiones, estaba intacto y los mionúcleos ocupaban su habitual posición subsarcolémica.

Por el contrario, en el grupo RD sí observaron células satélite activadas, algunas de las cuales mostraban lo que parecían ser áreas o puntos de fusión que se correspondían con zonas de continuidad entre el citoplasma de la célula satélite con el sarcoplasma de la fibra muscular. El citoplasma era grande y contenía perfiles de retículo endoplásmico rugoso, ribosomas libres, polirribosomas y mitocondrias (fig. 31b); a veces contenía aparato de Golgi y centriolos. La mayoría de las fibras musculares denervadas contenían miofibrillas adelgazadas con pérdida de miofilamentos, alteración del alineamiento y discreta desorientación.

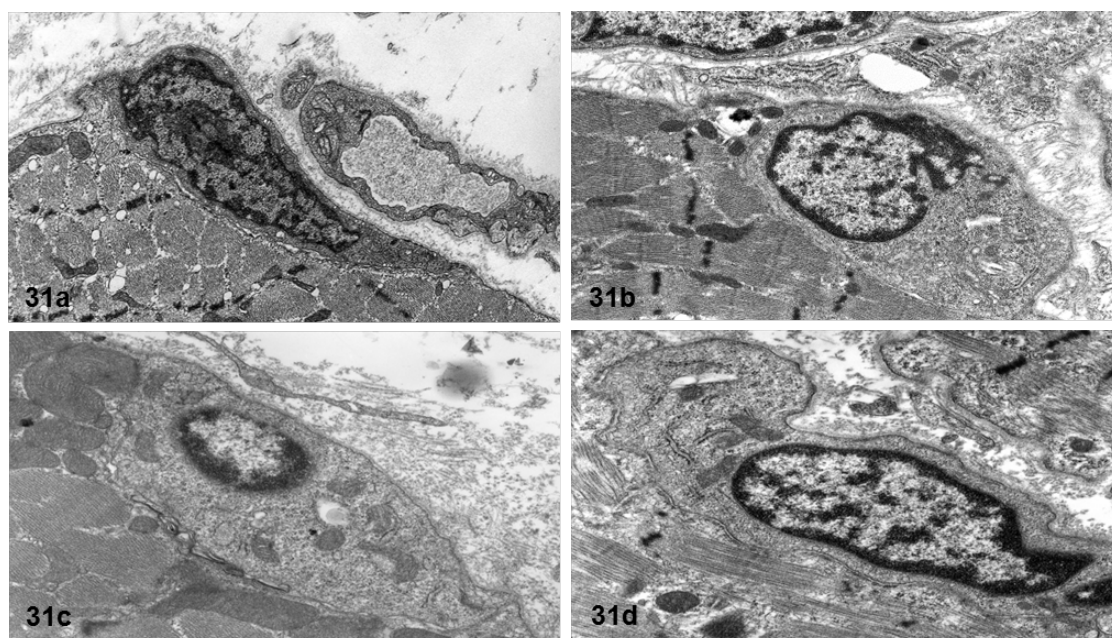


Figura 31. Micrografías electrónicas de secciones de músculo sóleo representativas de animales correspondientes a los grupos (a) RN, (b) RD, (c) RN+ExMd y RD+ExMd. (a) Célula satélite en reposo o quiescencia. (b-d) Células satélites activadas mostrando un aumento de la proporción citoplasma/núcleo. (a y c) 6600 x, (b) 8900 x, (d) 11500 x.

La reacción de activación de las células satélites fue confirmada morfométricamente y se debió a un aumento significativo del citoplasma, lo que podría estar en buena relación con los perfiles desmina+ vistos en microscopía de luz. Con excepción del grupo RN, la activación ocurrió en todos los grupos, pero en ningún caso afectó a todas las células satélites observadas. Mientras que en el grupo RN el 40% mostraban rasgos ultraestructurales de activación, en los grupos RN+ExMd y RD+ExMd el porcentaje alcanzó al 58 y 61% respectivamente (figs. 31c y d).

En este último caso, es importante destacar que la respuesta de la población de células satélites dentro de un mismo músculo no fue homogénea ya que, mientras unas mostraban rasgos morfológicos de activación, otras presentaban características de reposo.

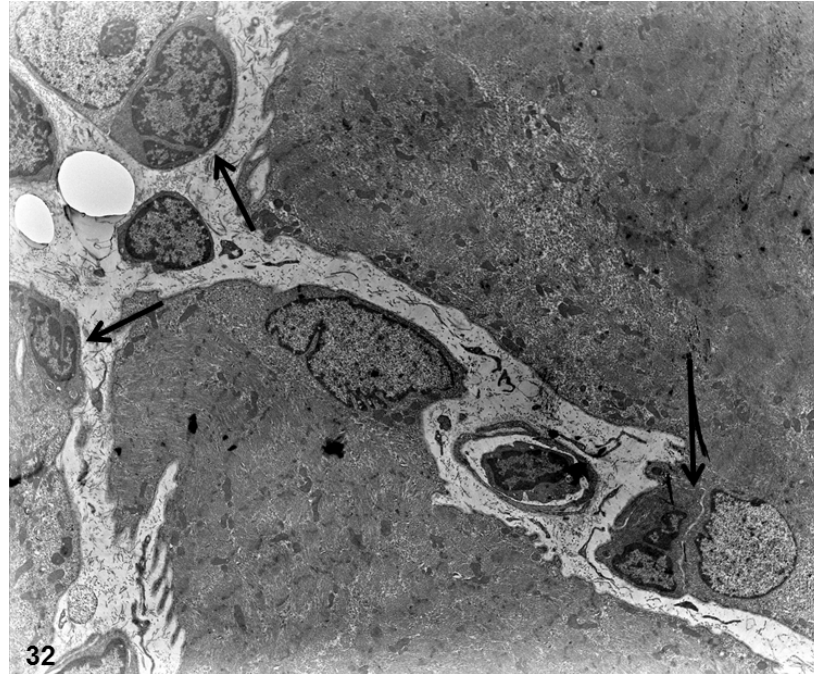


Figura 32. Micrografía electrónica de músculo sóleo perteneciente al Grupo RD+ExMd. Obsérvese como en una pequeña área llegan a observarse hasta tres células satélites flechas

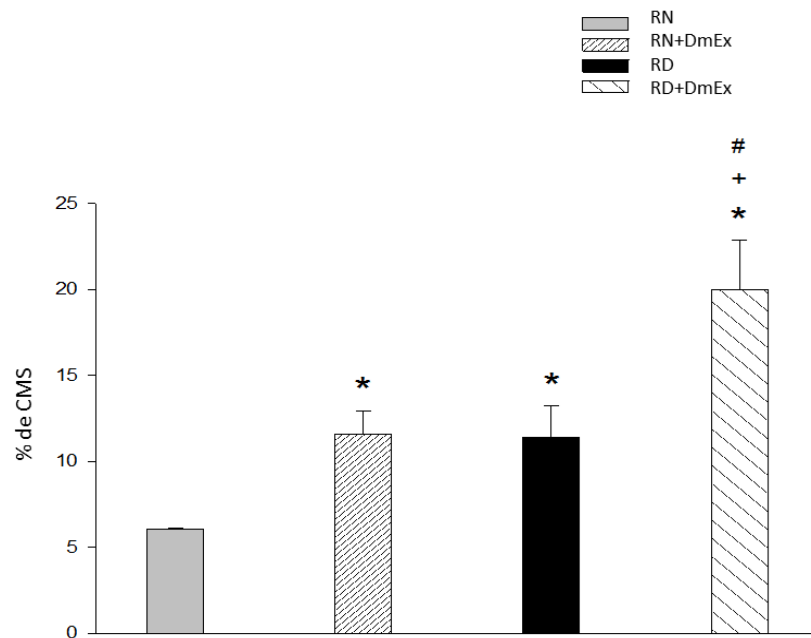


Figura 33. Frecuencia de células satélites en los cuatro grupos analizados. La proporción de células satélites es expresada como un porcentaje del total del número de núcleos identificados en las fibras musculares. * Significativamente diferente con el grupo RN; + significativamente diferente del grupo RN+ExMd; significativamente diferente del grupo RD. Los valores se corresponden con las medias \pm DS, $n = 4$ ratas/grupo.

El estudio cuantitativo mostró, en comparación con el grupo NR, un incremento significativo del número de núcleos y mionúcleos por fibra similar en los tres grupos RN+ExMd (2.41 ± 0.37 núcleos/fibra y 2.15 ± 0.33 mionúcleos/fibra), RD (2.92 ± 0.61 núcleos/fibra y 2.54 ± 0.41 mionúcleos/fibra) y RD+ExMdx (2.87 ± 0.49 núcleos/fibra y 2.30 ± 0.45 mionúcleos/fibra). También la frecuencia de células satélite se vió incrementada en los tres grupos con respecto al control, aunque el aumento fue significativamente mayor para el grupo DR+DmEx (fig. 33). Sin embargo, no hubo correlación con el número de núcleos por fibra que se mantuvo estable, lo que puede ser explicado por las variaciones en el área de la fibra muscular.

Sólo en los grupos tratados con extracto se observaron como los pericitos tenían un amplio citoplasma con organelas y mantenían su lámina basal, aunque, se encontraban claramente alejados del capilar. También fueron encontradas en el intersticio, células mononucleadas que recordaban a células satélite, con núcleo heterocromático y un escaso citoplasma con vesículas de micropinocitosis; sin embargo, aunque próximas a la fibra muscular, se encontraban aisladas y envueltas por completo por una lámina basal. También fueron vistas células junto a capilares que se encontraban muy próximas a la fibra muscular; curiosamente en su cara adyacente a ésta carecían de lámina basal, mientras que en la cara opuesta la mantenían (fig. 34). En otros casos, se vieron células mononucleadas que parecían estar siendo incorporadas a la fibra muscular, ya que ésta emitía prolongaciones citoplasmáticas a modo de pseudópodos (fig. 34).

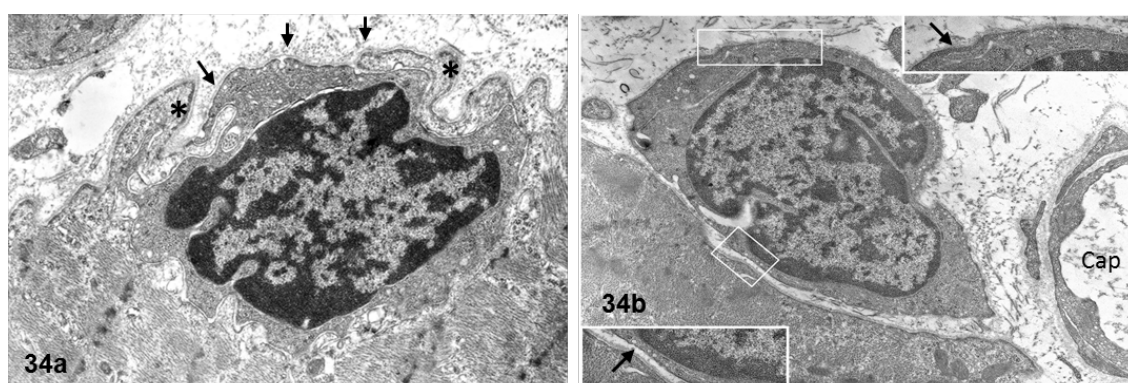


Figura 34. Micrografías electrónicas correspondientes al Grupo RD+ExMd. (a) Se observa proyecciones papilares de la fibra muscular que parecen “abrazar o atrapar” a una célula mononucleada (asterisco) que queda cubierta por la lámina basal (flechas), 8900 x. (b) Una célula muy próxima a la fibra muscular y a la vecindad de un capilar (cap); Nótese que en su cara externa está cubierta por lámina basal (inserto superior) mientras que carece de ella en la cara que mira a la fibra muscular (inserto inferior), 5200 x.

Discusión

75

Hipertrofia y atrofia muscular en ratas normales provocada por la administración de diferentes extractos musculares.....	77
DmEx promueve la recuperación de la atrofia mediante la activación de las células satélites.....	83
Futuras líneas de trabajo.....	90

Hipertrofia y atrofia muscular en ratas normales provocada por la administración de diferentes extractos musculares

Conocer la respuesta de las fibras musculares y sus células satélites a los cambios que se establecen en el microambiente tisular es clave para mejorar las técnicas en medicina regenerativa e ingeniería tisular (White y Grounds, 2003, Cao *et al.*, 2005). Uno de los modelos experimentales que permiten recrear el microambiente tisular en determinadas situaciones es el ensayo de extractos musculares tanto *in vitro* como *in vivo*. Extractos obtenidos de músculo aplastado (Chen y Quinn, 1992, Bischoff y Heintz, 1994, Bischoff, 1997, Cheng *et al.*, 2005), de la regeneración de tritón (McGann *et al.*, 2001), o a partir de extracto de matriz extracelular de músculo esquelético (Stern *et al.*, 2009) estimulan la miogénesis o el control de la diferenciación de los mioblastos (Matsuoka y Inoue, 2008).

Una de las situaciones que más dañan al músculo esquelético es la pérdida de su inervación motora. La maduración y propiedades de los músculos esqueléticos están moduladas por factores neurales y no neurales como potenciales de acción, actividad contráctil, y la mediación de sustancias neurotróficas conocidas y desconocidas (Hyatt *et al.*, 2003, Hyatt *et al.*, 2006). Cuando un músculo es denervado ocurren cambios, bien como resultado de demandas metabólicas alteradas o bien relacionados con el establecimiento de unas condiciones óptimas para la reinervación de las fibras musculares (Magnusson *et al.*, 2005). De hecho, tras la denervación del músculo esquelético adulto se inicia una reactivación de la miogénesis (Borisov *et al.*, 2001) que afecta a la actividad de las células satélites (Bornemann *et al.*, 1999, Yoshimura y Harii, 1999). Se desconoce si la denervación afecta a la actividad de las células satélites directamente o a través de factores que se difunden por el tejido liberados por las fibras musculares (Schmalbruch y Lewis, 2000, Ehrhardt y Morgan, 2005).

Es por esto que un músculo con pérdida de su inervación motora puede, al menos en sus primeras fases, constituirse en una rica fuente de señales que puedan afectar tanto a fibras musculares y células satélites como a motoneuronas. En este

sentido, se ha comprobado que extractos de músculo esquelético contienen factores neurotróficos que promueven la supervivencia de motoneuronas *in vitro* (Valmier *et al.*, 1990, Comella *et al.*, 1994). Asimismo, extractos obtenidos de músculo sóleo denervado tienen un efecto miotrófico *in vivo* sobre músculo sóleo de ratas normales que viene dado por la hipertrofia de fibras musculares y la formación de nuevas fibras (Jimena *et al.*, 1993, Peña *et al.*, 1995, Jimena *et al.*, 1998).

Sin embargo, la disrupción del control regulador motor y trófico del nervio también parece provocar respuestas diferentes en función del tipo de músculo. Por ejemplo, se sabe que en la denervación la atrofia es mucho más marcada en los músculos rápidos que en los músculos lentos (Dedkov *et al.*, 2003) e incluso mientras que los músculos compuestos exclusivamente por fibras blancas se atrofian, los rojos se hipertrofian inicialmente (Bakou *et al.*, 2014). Además, aunque se desconoce la razón, parece ser que la influencia neural sobre la diferenciación de las células satélites es mayor en los músculos rojos que en los blancos (Hyatt *et al.*, 2006).

Está bien establecida la heterogeneidad histológica y funcional de los músculos rojos y blancos, así como las diferencias de sus fibras musculares y células satélites en sus respuestas adaptativas al ejercicio (Darr y Schultz, 1987), envejecimiento (Carter *et al.*, 2010), susceptibilidad a la lesión (Luque *et al.*, 2015), regeneración postlesión (Bassaglia y Gautron, 1995), número (Gibson y Schultz, 1982), características morfométricas (Baranska *et al.*, 1997) o potencial miogénico *in vitro* (Lagord *et al.*, 1998). Basándonos en estas diferencias entre músculos rojos y blancos, y concretamente en su reacción a la pérdida de inervación, nosotros pensamos que los efectos de extractos musculares obtenidos de músculo rojo o blanco y también la respuesta podrían ser diferentes.

En el presente estudio analizamos si extractos obtenidos a partir de músculos sóleo (músculo típicamente rojo con un 85-100% de fibras lentas) y extensor digital largo (EDL) (músculo típicamente blanco con un 95% de fibras rápidas) normales y denervados tienen efectos similares sobre músculos sóleo y EDL de ratas normales.

Para nuestra sorpresa, mientras que los extractos obtenidos a partir de músculo sóleo provocaron una hipertrofia en ambos músculos, los extractos de músculo EDL indujeron atrofia sobre los músculos EDL, pero no sobre los músculos sóleos.

Nuestro estudio mostró que extractos obtenidos de músculos denervados indujeron *in vivo*, en músculos esqueléticos normales, una respuesta de hipertrofia o atrofia según si el extracto hubiera sido obtenido de músculo sóleo o EDL respectivamente. Esto plantea que tras la sección del nervio, los diferentes tipos de músculos modificarían su microambiente tisular acumulando, entre otras, sustancias miotróficas o atróficas contenidas en los extractos. Estos resultados están en buena relación con el hecho de que existan factores neurales independientes de la actividad eléctrica que juegan un papel esencial en los procesos de miogénesis y crecimiento del músculo esquelético y que parecen diferir entre músculos lentos y rápidos (Hyatt *et al.*, 2003, Hyatt *et al.*, 2006).

Puesto que tanto los músculos sóleo como EDL respondieron con una hipertrofia y mayor respuesta miogénica cuando las ratas fueron tratadas con extractos obtenidos de músculo sóleo, parece evidente que son los factores contenidos en éste los responsables de esta respuesta. Es interesante señalar que extractos de músculo *anterior latissimus dorsi* ALD (músculo rojo) pero no de *pectoralis major* (músculo blanco) tienen un efecto estimulador sobre la miogénesis de mioblastos embrionarios de ambos músculos en cultivos celulares (Matsuda *et al.*, 1983). Nuestra conclusión se ve reforzada por el hecho de que la propia respuesta a la denervación difiere entre músculos. Se ha demostrado que el músculo *anterior latissimus dorsi* y el músculo *posterior latissimus dorsi* (PLD, compuesto exclusivamente por fibras rápidas) privados de su inervación sufren diferentes modificaciones morfológicas: mientras que tras la denervación el músculo PLD se atrofia progresivamente, el músculo ALD se hipertrofia (Bakou *et al.*, 2014).

Para nuestra sorpresa el músculo EDL, pero no el sóleo, respondió con una atrofia muscular cuando las ratas fueron tratadas con extractos de músculo EDL. En este

caso las diferencias deben de estar en relación con los rasgos específicos del tipo de músculo. Esto podría explicar las diferencias encontradas en las respuestas de los músculos sóleo y EDL a los extractos. Se ha señalado que los efectos miotróficos o atróficos de determinadas sustancias como factores de crecimiento pueden depender de las características metabólicas del músculo esquelético (Martin *et al.*, 1996). Nuestro estudio revela una mayor susceptibilidad de las fibras tipo II. Curiosamente existen muchos datos que relacionan la atrofia con los músculos blancos; por ejemplo, la atrofia de fibras tipo II es uno de los cambios más frecuentes en patología muscular humana observándose en un gran número de trastornos o enfermedades diversas (Carpenter y Karpati, 2001). Asimismo los músculos rápidos sufren una mayor atrofia que los lentos tras la denervación (Bobinac *et al.*, 2000, Dedkov *et al.*, 2003) o en respuesta a la inanición o enfermedad hepática (Weber *et al.*, 1992). En esta línea no deja de ser llamativo que las motoneuronas que inervan a los músculos *fast-twitch* se afecten preferentemente en la esclerosis lateral amiotrófica conduciendo a una disminución del número de unidades motoras inervadas, mientras que esto no ocurre en el sóleo (Gordon *et al.*, 2007).

En consecuencia, esta mayor predisposición de los músculos blancos a la atrofia sugiere que los extractos obtenidos de músculo EDL contendrían factores capaces de inducir una atrofia. En nuestra opinión, esto es interesante ya que en nuestro estudio el tratamiento con los extractos se realizó a ratas normales, lo que plantea el importante papel que de por sí tendrían factores de tipo químico, no sólo en el desarrollo de la propia atrofia muscular, sino en las consecuencias indirectas sobre las motoneuronas. Se ha comprobado que extractos de músculo esquelético contienen factores neurotróficos que promueven la supervivencia de motoneuronas *in vitro* (Valmier *et al.*, 1990, Comella *et al.*, 1994), pero también, se ha señalado que un defecto en la función neurotrófica de la fibra muscular podría estar implicada en la muerte de las motoneuronas en la atrofia muscular espinal (Guettier-Sigrist *et al.*, 2002).

Puesto que el efecto tanto hipertrófico como atrófico de los extractos fue más potente cuando estos fueron obtenidos de músculos previamente denervados, resulta claro que la inervación debe de controlar la expresión de las sustancias o factores

incluidos en los extractos. Se sabe que ciertos rasgos del metabolismo muscular proteico se encuentran bajo regulación neural existiendo diferencias entre músculos rápidos y lentos en la rata (Guth y Watson, 1967) y que la denervación de un músculo esquelético conduce a importantes cambios moleculares y bioquímicos (Magnusson *et al.*, 2005) que pueden ayudar a entender los resultados obtenidos en nuestro estudio. Nuestros datos apuntan que en los procesos de atrofia e hipertrofia factores ligados a los tipos de músculos y controlados por la inervación, son muy importantes en el control de la maquinaria bioquímica que regula la masa muscular (Cassano *et al.*, 2009). Después de la denervación ocurre un marcado incremento de los mRNAs de los factores reguladores de la miogénesis y sus correspondientes proteínas que juegan un papel determinante en los procesos miogénicos en el músculo esquelético (Buonanno *et al.*, 1992, Hyatt *et al.*, 2003). Aunque existen discrepancias, varios estudios han comprobado que la expresión de los factores de transcripción y de las proteínas de la familia MyoD que se acumulan selectivamente en los diferentes tipos de músculos (Hughes *et al.*, 1993) se alteran gradualmente tras la denervación y de forma diferente en función del tipo de músculo (Voytik *et al.*, 1993, Sakuma *et al.*, 1999, Maier *et al.*, 2002). En este sentido, es interesante que la expresión de miogenina parezca contribuir a la atrofia muscular inducida por denervación (Macpherson *et al.*, 2011). También se sabe que la denervación regula, pero de una manera opuesta, los transcriptores de folistatina y miostatina implicadas en el crecimiento muscular (Armand *et al.*, 2003). Es por esto que un músculo con pérdida de su inervación motora, al menos en sus primeras fases, constituye una rica fuente de señales que pueden afectar tanto a las motoneuronas como a las propias fibras musculares.

En base a nuestras observaciones las células satélites parecen haber respondido a los extractos de músculo sóleo, pero no (o en menor medida) a los extractos de músculo EDL. Además, dado que la respuesta fue mayor para el músculo sóleo y para los extractos de músculo sóleo denervado se plantea que los músculos rojos deben de tener una mayor potencia miogénica. Se ha demostrado que la respuesta miogénica difiere entre ambos músculos tras la denervación, siendo mayor para el músculo EDL frente al sóleo, lo que parece estar en relación con una mayor dependencia de factores ligados al control neural en el músculo sóleo (Hyatt *et al.*, 2006). Aunque no está claro por qué la influencia neural dependiente de la actividad sobre la diferenciación de las células

satélites es mayor en los músculos lentos que en los rápidos (Hyatt *et al.*, 2006), nuestros resultados pueden apoyar este hecho. Al menos en nuestro modelo experimental, en presencia de una población intacta y funcional de células satélites, factores derivados de músculo sóleo denervado provocaron *in vivo* en los dos músculos estudiados un incremento en el tamaño de las fibras musculares y una respuesta miogénica mayor para músculo sóleo en comparación con el músculo EDL. Sin embargo, no debemos excluir que esta mayor respuesta también podría verse favorecida por el hecho de que el músculo sóleo dispone de un mayor número de células satélites (Gibson y Schultz, 1982) y de que son capaces de diferenciarse antes que las derivadas de músculo EDL (Ono *et al.*, 2010).

Si las señales contenidas en el extracto activan a las células satélites, también podrían haber activado la diferenciación en otras poblaciones adicionales con potencialidad miogénica existentes en el músculo esquelético. La observación de células desmina+, aisladas o en pequeños grupos, en el espacio intersticial hace pensar que esto ha ocurrido en nuestro experimento ya que todas las células intersticiales en músculo normal son negativas para desmina (Zhang y McLennan, 1994). También fue el músculo sóleo quien mostró un mayor número de estas células frente al músculo EDL, lo que sugiere que, al igual que ocurre con las células satélites el músculo sóleo, podría disponer de una población adicional de células miogénicas mayor que el músculo EDL. Esta posibilidad debe ser considerada ya que existen evidencias que demuestran que los pericitos representan una población con potencialidad miogénica en el músculo esquelético (Dellavalle *et al.*, 2007, Dellavalle *et al.*, 2011) y es bien conocido que el músculo sóleo posee una mayor densidad capilar que el EDL (Kubinova *et al.*, 2001). Aunque en nuestro estudio no podemos concretar con qué tipo celular pueden corresponderse las células intersticiales desmina+, el análisis ultraestructural reveló datos morfológicos que pueden relacionarlas con pericitos, como son sus rasgos citológicos (con mayor o menor grado de desarrollo citoplasmático) y especialmente por encontrarse rodeadas por completo de una lámina basal y cerca de los vasos capilares. Células ultraestructuralmente similares a éstas, han sido también observadas en músculos denervados (de Maruenda y Franzini-Armstrong, 1978), en músculos de rata sometidos a doble trasplante (Mong, 1988), en biopsias de niños malnutridos (Hansen-Smith *et al.*, 1979) y en la enfermedad de Werdnig-Hoffmann en las que se propuso que

pudieran ser los precursores de células satélites (van Haelst, 1970). Actualmente, se insiste en que la posición yuxtavascular de las células satélites parece tener importantes implicaciones en la combinación de la angiogénesis y miogénesis en la regeneración (Christov *et al.*, 2007, Mounier *et al.*, 2011) y como una fuente de suministro de nuevas células satélites (Dhawan y Rando, 2005).

En conclusión, el presente estudio sugiere que la respuesta muscular de atrofia e hipertrofia depende, al menos en parte, de factores específicos contenidos en el tipo de músculo y que parecen estar controlados por su innervación. En nuestra opinión estos resultados, que muestran claras diferencias entre los músculos lento y rápido, pueden ser de importancia para intentar estimular la miogénesis en situaciones patológicas que afectan al músculo esquelético. Además, nuestro modelo también puede resultar útil para estudiar la activación miogénica de otras células diferentes a las células satélites ya que no altera la estructura del músculo como en otros modelos de lesión.

DmEx promueve la recuperación de la atrofia mediante la activación de las células satélites

Es muy importante conseguir estimular la miogénesis en pacientes afectados por patologías neurogénicas intrínsecas o traumáticas (Carraro *et al.*, 2002). La célula satélite está considerada como la principal responsable de la respuesta miogénica en los procesos de crecimiento postnatal, hipertrofia y regeneración postlesión (Yablonka-Reuveni, 2011), por lo que conocer su comportamiento e interacción con su entorno en situaciones como la degeneración-regeneración, hipertrofia y atrofia es fundamental para diseñar terapias en trastornos y lesiones neuromusculares (Machida y Booth, 2004; Kuang y Rudnicki, 2008; Gayraud-Morel *et al.*, 2009; Bischoff y Franzini-Armstrong *et al.*, 2004). Se sabe que uno de los factores que controlan la actividad de las células satélites es la innervación (Bischoff, 1990; Bornemann *et al.*, 1999; Cornelison, 2008) y que tras la denervación del músculo esquelético adulto se inicia una reactivación de la miogénesis (Buonanno y Rosenthal, 1996; Borisov *et al.*, 2001; Dedkov *et al.*, 2001). Posiblemente este restablecimiento de las condiciones embrionarias hace que el músculo denervado sea un tejido muy activo tanto a nivel celular como molecular y que, aunque vaya disminuyendo su masa conforme avanza el tiempo postdenervación, los

músculos mantengan cierta capacidad regenerativa (Carlson *et al*, 2002). Por tanto, un músculo denervado debe ser, al menos inicialmente, una rica fuente de señales que podrían activar precursores de células miogénicas, como también lo es el músculo regenerativo (De Angelis *et al*, 1999). Esto explicaría la evidencia de miogénesis observada en biopsias humanas con atrofia muscular neurogénica (Doppler *et al*, 2008) y en modelos animales de atrofia muscular por denervación (Borisov *et al*, 2001; Carlson *et al*, 2002; Schmalbruch y Lewis, 1994; Carraro, 2002; Rodrigues y Schmalbruch, 1995) en las que es frecuente encontrar nuevas fibras musculares.

No está claro si la denervación afecta transitoriamente a la actividad de las células satélites directamente o por factores liberados por las fibras musculares o desde el propio nervio lesionado (Kuschel *et al*, 1999; Bornemann *et al*, 1999, Yoshimura y Harii, 1999; Schmalbruch y Lewis, 1994; Ehrhardt y Morgan, 2005). Incluso se atribuye que un déficit de estos factores podría ser también responsable, al menos en parte, de una escasa disponibilidad de células satélites (Schmalbruch, 1990; Jejurikar y Kuzon, 2003) o de su incapacidad para fusionarse con las fibras musculares, contribuyendo así a una regeneración abortiva en la postdenervación (Viguie *et al*, 1997; Borisov *et al*, 2005).

Por tanto, parece evidente que el músculo esquelético mantiene, al menos durante cierto tiempo, su capacidad regenerativa tras la pérdida de inervación, por lo que resulta muy importante buscar estrategias que aprovechen esta situación para estimular la capacidad miogénica en los músculos afectados. Recientemente, Van der Meer *et al* (2011) han señalado que cuando ocurren situaciones asociadas con la denervación es aconsejable comenzar el tratamiento de la atrofia tan pronto como sea posible, cuando el número de ribosomas y células satélites todavía es elevado y la atrofia a gran escala aún no se ha establecido. En estudios previos hemos mostrado que un extracto obtenido a partir de músculo denervado tiene efectos miotróficos sobre el músculo sóleo normal de rata (Jimena *et al*, 1993; 1998) y es capaz de activar a las células satélites (Peña *et al*, 1995). Por esta razón, hemos analizado la respuesta de las células satélites en músculo sóleo de ratas denervadas a corto plazo cuando son tratadas con extracto de músculo denervado. Nuestros resultados muestran evidencias que confirman que este extracto activa a parte de la población de células satélites y a células ubicadas en el espacio extracelular hacia la diferenciación miogénica promoviendo la

neoformación de fibras musculares. Interesantemente, esta respuesta miogénica se vió potenciada cuando el tratamiento se realizó a ratas denervadas, lo que podría explicarse por un efecto combinado de la propia denervación y el provocado por el extracto muscular sobre la población de células satélites. En nuestra opinión estas observaciones podrían ser de interés clínico ya que sugieren aplicaciones terapéuticas para tratar algunas patologías neuromusculares.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio son coherentes con estudios anteriores (Jimena *et al*, 1993; 1998; Peña *et al*, 1995) y apoyan el hecho de que la liberación de factores tróficos durante la denervación estaría implicada en la respuesta de activación de las células satélites. Sin embargo, no parece que los músculos del grupo NR+DmEx hayan estado expuestos a los mismos factores con los que se encuentra un músculo denervado. Aunque similares en la respuesta de las células satélites, la respuesta miogénica fue significativamente mayor para el grupo NR+DmEx frente al grupo DR; en este último grupo no se observaron células intersticiales desmina+ ni tampoco fibras pequeñas desmina+. Estas diferencias podrían explicarse porque las ratas del grupo DR fueron sacrificadas a los 10 días, mientras que el extracto muscular empleado fue obtenido a los 4 días de la sección del nervio. El tiempo postdenervación parece tener importancia en la potencialidad de recuperación muscular; nosotros hemos demostrado que el tiempo transcurrido entre la denervación y la obtención del extracto influye sobre el efecto miotrófico del extracto (Jimena *et al*, 1998). También, la recuperación del músculo esquelético por reinervación tras la denervación, está dificultada cuando el período de ésta excede de 7 días (Finkelstein *et al*, 1993).

El hecho de que el porcentaje de células satélites activadas fuese similar (alrededor de un 60%) en los dos grupos que recibieron el extracto sugiere que el factor o factores tróficos contenidos en el extracto: i. actúan de una manera similar sobre la población de células satélites, independientemente del estado de inervación del músculo, y ii. podrían haber activado a una población específica de células satélites. Está bien establecido que existen básicamente dos subpoblaciones o compartimentos, proliferativo y diferenciativo, (Kuschel *et al*, 1999; Rantanen *et al*, 1995) que parecen responden a señales diferentes (Tatsumi *et al*, 1998) . Puesto que no fueron vistos

núcleos PCNA+ ni mitosis de células satélites, se podría pensar que en el extracto sólo hubiera el compartimento diferenciativo.

La observación ultraestructural de procesos de fusión en los grupos DR, NR+DmEx y DR+DmEx, indicaría la incorporación de la célula satélite a la fibra muscular a la que se asocian. Ha sido referido que un extracto de músculo de rata contiene factores específicos que incrementan significativamente la fusión de mioblastos donantes con las fibras musculares del huésped (Cheng *et al*, 2005). Puesto que las células satélites contribuyen como fuente de mionúcleos en el crecimiento postnatal e hipertrofia de las fibras musculares (Allen *et al*, 1999), su respuesta de activación debió estar ligada al efecto miotrófico del extracto. En el caso del grupo NR+DmEx los procesos de fusión de las células satélites contribuirían a la hipertrofia que induce el extracto sobre las fibras musculares (Jimena *et al*, 1993; Peña *et al*, 1995), mientras que en los grupos DR y DR+DmEx lo podemos interpretar como un mecanismo para compensar la pérdida mionuclear en las fibras atroficas (Schmalbruch y Lewis, 2000, McGeachie *et al*, 1989; Carlson, 2004; Borisov *et al*, 2005). En nuestro estudio fueron observados núcleos MyoD+ tanto asociados a fibras musculares como en intersticio; esto está en buena relación con el aumento de la expresión de MyoD en mionúcleos y células satélites durante la primera semana postdenervación y se interpreta como un intento de prevenir la atrofia muscular (Ishido *et al*, 2004). Por el contrario, otros autores señalan que, por lo menos en un corto plazo, no hay pérdida de núcleos durante la atrofia en ratones (Gundersen y Bruusgaard, 2008). Sin embargo, en nuestro caso el número de mionúcleos por fibra en los músculos del grupo DR no mostró un descenso, sino que por el contrario se encontraba significativamente incrementado con respecto al grupo NR. Esta discrepancia, puede ser explicada por la reducción en el tamaño de las fibras musculares que a los 10 días representó el 43% del tamaño de una fibra muscular normal. Otra posible explicación puede estar relacionada con el aumento en la frecuencia de células satélites a los 10 días (11,42%) en comparación con el 6% de células satélites que se encuentra en las fibras musculares normales. Estos datos están en buena relación con el incremento, desde un 4% a un 8%, que se establece en la población de células satélites tras 3-4 días postdenervación (Viguie *et al*, 1997).

Es importante señalar que, mientras que la respuesta miogénica en el grupo DR se limitó a la población de células satélites, en el grupo DR+DmEx esta respuesta fue

significativamente mayor, e incluyó además la aparición de células miogénicas y neoformación de fibras. La capacidad de que el microambiente de un músculo denervado sea un territorio adecuado para la miogénesis se apoya en muchos estudios. Se sabe que la denervación a corto plazo o aguda provoca una disrupción del tejido que da lugar a un aumento en el número de células satélites y células del intersticio, probablemente por la liberación de algún mitógeno (McGeachie, 1989; Murray y Robbins, 1982). Además, es relativamente frecuente encontrar fibras musculares de pequeño tamaño y con rasgos tintoriales de inmadurez, diferentes a las fibras atroficas, sugestivas de una respuesta miogénica en estudios experimentales de denervación muscular (Dedkov *et al*, 2001) o en biopsias musculares de pacientes con enfermedades neurogénicas (Doppler *et al*, 2008).

En nuestro caso, aunque en el grupo DR fue evidente un mayor número de núcleos, la presencia de ocasionales células intersticiales desmina+ y la ausencia de pequeñas neofibras indicó que la denervación había inducido una escasa diferenciación miogénica en la zona intersticial; esta aparente discrepancia puede explicarse porque la presencia de nuevas fibras o miotubos es vista en tiempos avanzados de denervación (Borisov *et al*, 2001; Dedkov *et al*, 2001), mientras que el período de denervación en el grupo RD fue sólo de 10 días. Por el contrario, en los dos grupos de tratamiento con DmEx sí hubo presencia significativa de células intersticiales y pequeñas fibras musculares desmina+ (mayor en el grupo DR+DmEx) y confirmando que este tipo de extracto tiene capacidad para inducir la formación de nuevas fibras musculares (Peña *et al*, 1995). Aunque en el presente estudio no hemos empleado como control ratas inyectadas con extracto obtenido a partir de músculos normales, en estudios previos sí fue comprobado que, aunque estos tienen capacidad miotrófica ésta es significativamente menor a la del extracto de músculo denervado (Jimena *et al*, 1993; 1998).

En buena relación con lo referido en otros modelos experimentales (Tamaki *et al*, 2002a; 2002b) nuestro estudio ofrece evidencias morfológicas de que células ubicadas en el intersticio participaron en la génesis de nuevas fibras musculares. Aunque no podemos determinar con certeza el origen de las células miogénicas ubicadas en el espacio extracelular, diferentes tipos celulares están siendo implicados

como potenciales precursores de células musculares, sin excluir que los mioblastos intersticiales podrían derivar de las células satélites (Schultz, 1978; Lu *et al*, 1997; Collins *et al*, 2005). En cualquier caso, parece que el extracto empleado en nuestro estudio podría tener capacidad para estimular la diferenciación miogénica no sólo de las células satélites sino también de otras. Es interesante señalar que células madre derivadas de la médula ósea han sido inducidas a entrar en la línea miogénica cuando se cultivan con extractos de músculo lesionado, pero no con extractos de músculo normal (Santa Maria *et al*, 2004).

De estos precursores con capacidad para contribuir en alguna medida a los procesos de crecimiento postnatal, hipertrofia y regeneración tras la lesión, los pericitos asociados a los capilares musculares, parecen ser una subpoblación de células madre (Peng y Huard, 2004; Peault *et al*, 2007; Otto *et al*, 2009) que pueden comprometerse hacia la línea miogénica como consecuencia de la influencia microambiental (Peng y Huard, 2004; Bianco y Cossu, 1999; Dellavalle *et al*, 2007). En este sentido, si consideramos que en nuestro modelo se combinan la respuesta miogénica inducida por la propia denervación y la provocada por el extracto, estaríamos ante una modificación “forzada” y “no natural” del microambiente tisular que podría actuar como señal reclutando otros tipos celulares para participar en la respuesta miogénica vista en el grupo DR+DmEx. Aunque nuestras observaciones no nos permiten confirmar que los pericitos estén participando en la respuesta miogénica inducida por el extracto en los dos grupos algunas de nuestras observaciones podrían apoyarlo.

En el caso de una lesión focal, los pericitos pueden ser liberados de su posición vascular en respuesta a estímulos quimiotácticos, funcionando como células madre e inmunomoduladoras (Crisan *et al*, 2008). Hoy parece bien demostrada su contribución no sólo a los procesos regenerativos sino también como una posible fuente de repoblación de las células satélites (Dellavalle *et al*, 2007; 2011). De hecho, nuestras observaciones morfológicas son sugestivas de que el extracto habría estimulado a los pericitos. Muchos de ellos se encontraron activados y separados o alejados de su posición habitual con los capilares, aunque manteniendo su lámina basal. También células de pequeño tamaño muy parecidas a células satélites, completamente separadas de la superficie de las fibras musculares y rodeadas por completo de lámina basal se vieron en los grupos tratados con extracto muscular. Células iguales a éstas en

morfología y localización han sido referidas en estudios clásicos que las relacionan con pericitos (van Haelst 1970; de Maruenda y Franzini-Armstrong, 1978; Hansen-Smith *et al*, 1979). Igualmente se ha observado que en la denervación las células satélites pueden abandonar las fibras a las que se asocian mediante procesos de secuestación por invaginación de la lámina basal entre la célula satélite y la fibra muscular, o por mecanismos de migración atravesando la lámina basal y dirigiéndose al espacio endomisial (Borisov *et al*, 2005; Ontell, 1975; Laule y Bornemann, 2001). En nuestro caso parece incoherente que mientras unas células satélites activadas estén fusionándose con la fibra muscular, otras estuviesen abandonándola. Además, debería existir interposición de lámina basal entre las células satélites y la fibra muscular en el caso de que estuviese abandonándola, fenómenos que no han sido observados en nuestro estudio. Por tanto, otra posibilidad sería que se estuvieran incorporando a la fibra muscular.

La incorporación de precursores miogénicos de origen exógeno a “posición satélite” se ha comprobado en diferentes experimentos (Bittner *et al*, 1999; Skuk *et al*, 2002; Kuang *et al*, 2009). Se ha planteado la posibilidad, de que una subpoblación de células satélites podría abastecerse por la migración de células desde el intersticio o desde la circulación a ocupar una posición sublamina (Dhawan y Rando, 2005). Nuestras observaciones en microscopía electrónica de células intersticiales con pérdida parcial de lámina basal y de proyecciones citoplasmáticas de la fibra muscular “envolviendo” a células mononucleadas, podrían interpretarse como sugestivas de una incorporación de precursores miogénicos exógenos.

En resumen, los presentes hallazgos muestran claramente que el extracto obtenido de músculo sóleo denervado DmEx estimuló la respuesta miogénica a partir de la activación de células satélites, células ubicadas en intersticio y formación de nuevas miofibras, tanto en músculo innervado como en músculo denervado. Este efecto fue más potente sobre músculo denervado, lo cual podría tener implicaciones importantes para la potencial mejora de la miogénesis en diversas situaciones clínicas. Sin embargo, en el caso de músculos con pérdida de su innervación se debe tener en cuenta que la completa recuperación no llegaría a menos que las fibras nerviosas motoras puedan hacer

contacto funcional con las fibras musculares (Carlson *et al*, 2002a; Carlson *et al*, 2002b; Lu *et al*, 1997).

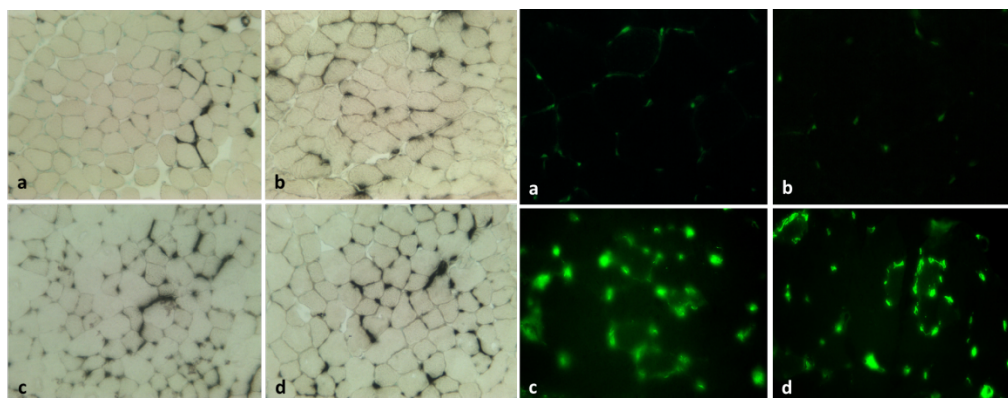
Recientemente Xing *et al* (2015) han analizado la posible influencia de estimulación eléctrica sobre las células satélites en músculos denervados. En este sentido los autores encuentran que el incremento en la expresión de miosina embrionaria, el aumento de regeneración y el restablecimiento de la función muscular son el resultado de una mejora en la diferenciación de las células satélites por estimulación eléctrica. Si bien ellos encuentran un incremento de células Pax7+ y MyoD con la estimulación eléctrica en la lesión del nervio, sin embargo, pensamos que algunos de estos criterios de valoración no están bien fundamentos. En concreto ellos valoran el aumento de “fibras regeneradas (con núcleos centrales derivadas de células satélites nuevamente fusionadas)”; pero es bien conocido que en la denervación no existe regeneración (Grounds, 2014).

Futuras líneas de trabajo

Por tanto, en base a los resultados obtenidos, nuestro modelo experimental podría resultar útil para analizar la implicación de los pericitos en la regeneración muscular y la renovación del nicho de células satélites. En este sentido nos encontramos realizando un estudio que pretende monitorizar el comportamiento de los pericitos bajo condiciones de estimulación de la miogénesis mediante la utilización de extractos tanto de músculo denervado como lesionado (Giovanetti-González *et al*, 2017). Para ello emplea ratones de la cepa C57B/L6 modificados transgénicamente para expresar la proteína verde fluorescente GFP (*green fluorescent protein*) bajo el promotor de aSMA (utilizada como marcador de localización o para observar la progresiva cercanía y vecindad entre pericitos y células satélites durante el crecimiento postnatal (Birbrair *et al*, 2015; Kostallari, *et al*, 2015; Wong *et al*, 2015).

Los pericitos han demostrado poseer cualidades de célula madre, por lo que se piensa que puedan ser el precursor *in vivo* de las células madre mesenquimales (Crisan *et al*, 2012; Wong *et al*, 2015), si bien su diferenciación hacia líneas celulares mesenquimales o neurales dependerá del microambiente (Birbrair *et al*, 2013). El presente estudio analiza cambios microscópicos en la población de pericitos de músculo esquelético murino bajo condiciones que estimulan la miogénesis. Nuestra hipótesis plantea que extractos musculares obtenidos a partir de músculos denervados y músculos lesionados pueden activar a los pericitos hacia la línea miogénica en un músculo esquelético adulto (en ausencia de lesión) al modificar el microambiente tisular. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que, en nuestras condiciones experimentales, células fenotípicamente compatibles con pericitos incrementaron su número y además se activaron las células satélites que se diferenciaron hacia la línea miogénica.

Nuestros hallazgos confirmaron resultados previos en relación al carácter miotrófico de extracto obtenido a partir de músculo denervado además de demostrar similar potencia en cuanto a dicha capacidad del extracto de músculo regenerativo. Por otro lado, revelaron que los extractos de músculos denervados y lesionados poseen capacidad para aumentar el número de células que expresan aSMA en un músculo normal. Puesto que las células marcadas se corresponden fenotípicamente con pericitos cabría plantearse que los factores incluidos en los extractos estimulasen la respuesta miogénica no sólo en la población de células satélites sino también en los pericitos. Es interesante señalar que algunos autores describen la presencia de aSMA como marcador en células satélites inmaduras (Lancioni *et al*, 2007).



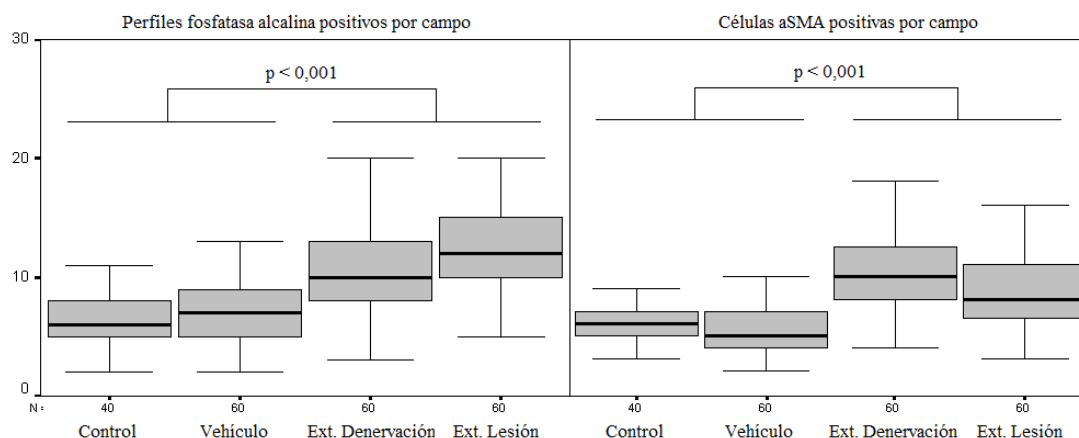


Figura 35. (a) Grupo control. (b) Grupo vehículo. (c) Grupo ExMd. (d) Grupo ExMr. Obsérvese como el número de capilares teñidos es mayor en los grupos tratados con extracto. Fosfatasa alcalina (a, b, c y d) 10x. Figura xx. Células aSMA+ mostrando una marcada fluorescencia verde (GFP). (a, b, c y d) 20x. Representación gráfica en box-plot que ilustra la distribución de las variables a estudio entre grupos. aSMA: alpha smooth muscle actin; Ext: extracto. (Giovanetti et al, 2017).

Este modelo podría resultar muy útil para esclarecer el papel de los pericitos en los procesos de crecimiento y regeneración del músculo esquelético. Además, estos resultados pueden ser de interés clínico, puesto que el reclutamiento de pericitos hacia la línea miogénica podría suponer un estímulo favorable en músculos patológicos.

Conclusiones

1. El presente estudio sugiere que la hipertrofia y atrofia muscular depende, al menos en parte, de factores específicos contenidos en el tipo de músculo que parecen estar controlados por la innervación. Pensamos que esto es importante a la hora de intentar estimular la miogénesis en condiciones patológicas que afectan al músculo esquelético.
2. Nuestros resultados demuestran que la administración parenteral de un extracto de músculo denervado promueve en un corto espacio de tiempo una respuesta miogénica en el músculo sóleo denervado de rata, lo cual facilita la recuperación de la atrofia. Esta respuesta se basa en la activación de las células satélite, células ubicadas en el intersticio y la formación de nuevas miofibras.
3. Cabe destacar que, si bien esta respuesta fue de naturaleza similar en control y músculo denervado, el efecto de tamaño fue de magnitud mucho mayor en denervado vs músculo esquelético intacto. Sin embargo, cabe señalar que es posible que el efecto de los extractos sobre la atrofia muscular no puede ser sistémico ya que, tanto el efecto como la respuesta de los músculos normales, parecen diferir dependiendo del tipo de músculo.
4. Estos hallazgos pueden tener implicaciones prácticas en la rehabilitación de problemas neuromusculares que requieren una mejora en la miogénesis.
5. Nuestro modelo experimental puede resultar útil para estudiar la activación miogénica de otros tipos celulares diferentes a las células satélite ya que no altera la histología muscular como ocurre en otros modelos de lesión.

Bibliografia

- Adams GR. *Role of insulin-like growth factor-I in the regulation of skeletal muscle adaptation to increase loading*. Exer. Sport Sci Rev, 26: 31-60. 1998.
- Adachi N, Sato K, Usas A, Cumins J, Pruchnic R, Fu FH. *Muscle derived cell based ex vivo gene therapy for treatment of full thickness articular cartilage defects*. J Rheumatol, 29: 1920-1930. 2002.
- Adami N, Biral D, Caccavale S, Rossini K. *Histology of the long-term denervated rat muscle*. Basic Appl Myol, 16: 113-114. 2006.
- Allen DL, Roy RR, Edgerton VR. *Myonuclear domains in muscle adaptation and disease*. Muscle Nerve, 22: 1350-1360. 1999.
- Allen RE, Sheehan SM, Taylor RG, Kendall TL, Rice GM. *Hepatocyte growth factor activates quiescent skeletal muscle satellite cells in vitro*. J Cell Physiol, 165: 307-312. 1995.
- Allouh MZ, Yablonka-Reuveni Z, Rosser BW. *Pax7 reveals a greater frequency and concentration of satellite cells at the ends of growing skeletal muscle fibers*. J Histochem Cytochem, 56:77-87. 2008.
- Almeida CF, Fernandes SA, Ribeiro Junior AF, Keith Okamoto O, Vainzof M. *Muscle satellite cells: exploring the basic biology to rule them*. Stem Cells Int, 2016:1078686. 2016
- Amack JD, Mahdevan MS. *Myogenic defects in myotonic dystrophy*. Dev Biol, 265: 294-301. 2004.
- Andersen JL. *Muscle fibre type adaptation in the elderly human muscle*. Scand J Med Sci Sports, 13: 40-47. 2003.
- Anderson JE. *Studies of the dynamics of skeletal muscle regeneration: the mouse came back!*. Biochem Cell Biol, 76: 13-26. 1998.
- Anderson JE. *A role for nitric oxide in muscle repair: nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells*. Mol Biol Cell, 11: 1859-1874. 2000.
- Anderson JE. *The satellite cell as a companion in skeletal muscle plasticity: currency, conveyance, clue, connector and colander*. J Exp Biol, 209: 2276-2292. 2006
- Appel MJ, Forsberg S, Hollmann W. *Satellite cell activation in human skeletal muscle after training: evidence for muscle fiber neoformation*. Int J Sports Med, 9: 297-299. 1988.
- Arechaga J, Diaz-Flores L, Sánchez G, Gayoso MJ. *Ultraestructura de la célula muscular satélite (myosatellitocytus) en fase de activación. Discusión de un nuevo modelo dinámico en los procesos de regeneración muscular*. Morf Norm Patol, Sec A, 3: 295-311. 1979.

Armand AS, Della Gaspera B, Launay T, Charbonnier F, Gallien CL Chanoine C. *Expression and neural control of follistatin versus myostatin genes during regeneration of mouse soleus*. Dev Dyn, 227: 256-265. 2003.

Asakura A, Komaki M, Rudnicki MA. *Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation*. Differentiation, 68: 245-253. 2001.

Bach AD, Beier JP, Ster-Staeter J, Horch RE. *Skeletal muscle tissue engineering*. J Cell Mol Med, 4: 413-422. 2004.

Bakou S, Cherel Y, Gabinaud B, Guigand L, Wyers M. *Type-specific changes in fibre size and satellite cell activation following muscle denervation in two strains of turkey*. J Anat, 188: 677-691. 1996.

Bakou S, Guigand L, Apreutese R, Apreutese A, Wyers M, Cherel Y. *Myocytes changes and satellite cells proliferation following denervation of ald (anterior latissimus dorsi) and pld (posterior latissimus dorsi) muscles in two strains of turkey (meleagris gallopavo)*. J Vet Anat, 7: 89-111. 2014.

Bani C, Llagrota-Candido J, Florindo Pinheiro DF, Correa Leite PM, Salimena MC, Henriques-Pons A, Quirico-Santos T. *Pattern of metalloprotease activity and myofiber regeneration in skeletal muscles of mdx mice*. Muscle Nerve, 37: 583-592. 2008.

Baranska W, Baran W, Shopinski P, Ziemia H. *Morphometric analysis of satellite cells in rat skeletal muscles: soleus and extensor digitorum longus*. Acta Anat, 160: 88-94. 1997.

Bareja A, Billin AN. *Satellite cell therapy – from mice to men*. Skeletal Muscle, 3:e2. 2013

Barjot C, Rouanet P, Vigneron P, Janmot C, d'Albis A, Bacou F. *Transformation of slow- or fast-twitch rabbit muscles after cross-reinnervation or low frequency stimulation does alter the in vitro properties of their satellite cells*. J Muscle Res Cell Motil, 19: 25-32. 1998.

Baroffio A, Hamann M, Bernheim L, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Bader CR. *Identification of self-renewing myoblasts in the progeny of single human muscle satellite cells*. Differentiation 60:47–57.1996

Bassaglia Y, Gautron J. *Fast and slow rat muscles degenerate and regenerate differently after whole crush injury*. J Muscle Res Cell Motil 16:420-429. 1995.

Beauchamp JR, Heslop L, Yu DSW, Tajbakhsh S, Kelly RG, Wernig A, Buckingham ME, Partridge TA, Zammit PS. *Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells*. J Cell Biol, 151: 1221-1233. 2000.

Bentzinger CF, Wang YX, Dumont NA, Rudnicki MA. *Cellular dynamics in the muscle satellite cell niche*. EMBO Rep, 14: 1062-1072. 2013.

Bianco P, Cossu G. *Uno, nessuno e centomila: searching for the identity of mesodermal progenitors*. Exp Cell Res, 251: 257-263. 1999.

Birbrair A, Zhang T, Wang Z-M, Messi ML, Enikolopov GN, Mintz A, Delbono O. *Skeletal muscle pericyte subtypes differ in their differentiation potential*. Stem Cell Res. 10: 67-84. 2013.

Birbrair A, Delbono O. *Pericytes are essential for skeletal muscle formation*. Stem Cell Rev Rep. 11: 547-48. 2015.

Biressi S, Rando TA. *Heterogeneity in the muscle satellite cell population*. Semin Cell Dev Biol, 8: 845-854. 2010

Bischoff R. *Proliferation of muscle satellite cells on intact myofibers in culture*. Dev Biol, 115: 129-139. 1986a.

Bischoff R. *A satellite cell mitogen from crushed adult muscle*. Dev Biol, 115: 140-147. 1986b.

Bischoff R. *The satellite cell and muscle regeneration*. En: Engel AG, Franzini-Armstrong C (eds). *Myology* 2nd ed, New York, McGraw-Hill, pp. 97-133. 1994.

Bischoff R. *Interaction between satellite cells and skeletal muscle fibers*. Development, 109: 943-952. 1990a.

Bischoff R. *Chemotaxis of skeletal muscle satellite cells*. Dev Dyn, 208: 505-515. 1997.

Bischoff R, Heintz C. *Enhancement of skeletal muscle regeneration*. Dev Dyn, 201: 41-54. 1994.

Bischoff R. *Control of satellite cell proliferation*. Myoblast Transfer Therapy: Springer, pp. 147-58. 1990.

Bischoff R, Franzini-Armstrong C. *Satellite and stem cells in muscle regeneration*. En: Engel AG, Franzini-Armstrong C (eds). *Myology*. Vol I. 3rd edition. New York, McGraw-Hill, pp: 66-86. 2004.

Bittner RE, Schofer C, Weipoltshammer K, Ivanova S, Streubel B, Hauser E, Freilinger M, Höger H, Elbe-Bürger A, Wachtler F. *Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice*. Anat Embryol (Berl). 199: 391-6. 1999.

Blaauw B, Reggiani C. *The role of satellite cells in muscle hypertrophy*. J Muscle Res Cell Motil, 35:3-10. 2014

Blaveri K, Heslop L, Yu DS, Rosenblatt JD, Gross JG, Partridge TA, Morgan JE. *Patterns of repair of dystrophic mouse muscle: studies on isolated fibers*. Dev Dyn, 216: 244-256. 1999.

Bloch-Gallego E, Huchet M, El M'Hamdi H, Xie FK, Tanaka H, Henderson CE. *Survival in vitro of motoneurons identified or purified by novel antibody-based methods selectively enhanced by muscle-derived factors*. Development, 111: 221-232. 1991.

Bobinac D, Malnar-Dragojevic D, Bajek S, Soic-Vranic T, Jerkovic R. *Muscle fiber type composition and morphometric properties of denervated rat extensor digitorum longus muscle*. Croat. Med. J. 41, 294-297. 2000).

Boldrin L, Morgan JE. *Human satellite cells: identification on human muscle fibres*. PLoS Curr. 3: RRN1294. 2012.

Boonen KJ, Post MJ. *The muscle stem cell niche: regulation of satellite cells during regeneration*. Tissue Eng Part B Rev: 14:419-431. 2008

Borisov AB, Dedkov EI, Carlson BM. *Interrelations of myogenic response, progressive atrophy of muscle fibers, and cell death in denervated skeletal muscle*. Anat Rec, 264: 203-218. 2001.

Borisov AB, Dedkov EI, Carlson BM *Abortive myogenesis in denervated skeletal muscle: differentiative properties of satellite cells, their migration, and block of terminal differentiation*. Anat Embryol, 209: 269-279. 2005a.

Borisov AB, Dedkov EI, Carlson BM. *Differentiation of activated satellite cells in denervated muscle following single fusions in situ and in cell culture*. Histochem Cell Biol, 124: 13-23. 2005b.

Bornemann A, Schmalbruch H. *Immunocytochemistry of M-cadherin in mature and regenerating rat muscle*. Anat Rec, 239: 119-125. 1994.

Bornemann A, Maier F, Kuschel R. *Satellite cells as players and targets in normal and diseased muscle*. Neuropaediatrics, 30: 167-175. 1999.

Brooks NE, Myburgh KH. *Skeletal muscle wasting with disuse atrophy is multi-dimensional: the response and interaction of myonuclei, satellite cells and signaling pathways*. Front Physiol.; 5: e99. 2014.

Buonanno A, Apone L, Morasso MI, Beers R, Brenner HR, Eftimie R. *The myod family of myogenic factors is regulated by electrical activity: Isolation and characterization of a mouse myf-5 cDNA*. Nucleic Acids Res, 20: 539-544. 1992.

Buonanno A, Rosenthal N. *Molecular control of muscle diversity and plasticity*. Dev Genet, 19: 95-107. 1996.

Campion DR. *The muscle satellite cell: a review*. Int Rev Cytol, 87: 225-251. 1984.

- Campos A. *Histología Médica*. Med Clín, 85: 63-65. 1985.
- Campos A. *Objetivos conceptuales y metodológicos de la investigación histológica*. Educ Med, 7: S36-S40. 2004.
- Cao B, Deasy BM, Pollett J, Huard J. *Cell therapy for muscle regeneration and repair*. Phys Med Rehabil Clin N Am, 16: 889-907. 2005.
- Cardasis CA, Cooper GW. *An analysis of nuclear numbers in individual fibers during differentiation and growth: a satellite cell-number fiber growth unit*. J Exp Zool, 191: 347-368. 1975.
- Carlson BM, Borisov AB, Dedkov EI, Dow D, Kostrominova TY. *The biology and restorative capacity of long-term denervated skeletal muscle*. Basic Appl Myol, 12: 247-254. 2002a.
- Carlson BM, Borisov AB, Dedkov EI, Khalyfa A, Kostrominova TY, Macpherson PC, Wang E, Faulkner JA. *Effects of long-term denervation on skeletal muscle in old rats*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 57: B366-74. 2002.
- Carlson BM. *Denervation and the aging of skeletal muscle*. Basic Appl Myol, 14: 135-139. 2004.
- Carpenter S. and Karpati G. *General aspects of skeletal muscle biology*. Pathology of Skeletal Muscle. S. Carpenter and G. Karpati, editors. Oxford University Press, New York pp.28-62. 2001.
- Carpenter S. *Electron microscopy in the study of normal and diseased muscle*. In: Karpati G, Hilton-Jones D, Griggs RC (eds). Disorders of voluntary muscle. 7th edn. Cambridge University Press, Cambridge, pp 296-318. 2001.
- Carter EE, Thomas MM, Muryinka T, Rowan SL, Wright KJ, Huba E, Hepple R.T. *Slow twitch soleus muscle is not protected from sarcopenia in senescent rats*. Exp. Gerontol, 45: 662-670. 2010.
- Cassano M, Quattrocelli M, Crippa S, Perini I, Ronzoni F, Sampaolesi M. *Cellular mechanisms and local progenitor activation to regulate skeletal muscle mass*. J. Muscle Res. Cell Motil. 30: 243-253. 2009.
- Carraro U. *Modulation of trophism and fiber type expression of denervated muscle by different patterns of electrical stimulation*. Basic Appl Myol, 12: 263-271. 2002.
- Carraro U, Rossini K, Zanin ME, Rizi C, Mayr W, Kern H. *Induced myogenesis in long-term permanent denervation: perspective role in functional electrical stimulation of denervated legs in humans*. Basic Appl Myol. 12: 53-64. 2002.
- Chang NC, Rudnicki MA. *Satellite cells: the architects of skeletal muscle*. Curr Top Dev Biol. 107: 161-81. 2014.

Chargé SBP, Rudnicki, MA. *Cellular and molecular regulation of muscle regeneration*. *Physiol Rev*, 84: 209-238. 2004.

Charifi N, Kadi F, Féasson L, Denis C. *Effects of endurance training on satellite cell frequency in skeletal muscle of old men*. *Muscle Nerve*, 28: 87-92. 2003.

Chazaud B, Sonnet C, Lafuste P, Bassez G, Rimaniol AC, Poron F, Authier FJ, Dreyfus PA, Gherardi RK. *Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth*. *J Cell Bio*, 163:1133-43. 2003.

Chen G, Quinn LS. *Partial characterization of skeletal myoblast mitogens in mouse crushed muscle extract*. *J Cell Physiol*, 153: 563-574. 1992.

Cheng L, Lai MD, Sanderson JE, Yu Cm, Li M. *Enhanced fusion of myoblasts with myofibers for efficient gene delivery induced by a partially purified protein fraction from rat muscle extract*. *Arch Biochem Biophys*, 384: 263-268. 2005.

Chiu RCJ, Zibaitis A, Kao RL. *Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation*. *Ann Thorac Surg*, 60: 12-18. 1995.

Chou SM, Nonaka I. *Satellite cells and muscle regeneration in diseased human skeletal muscle*. *J Neurol Sci*, 34: 131-145. 1977.

Christov C, Chrétien F, Abou-Khalil R, Bassez G, Vallet G, Authier FJ, Bassaglia Y, Shinin V, Tajbakhsh S, Chazaud B, Gherardi RK. *Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners*. *Mol Biol Cell*, 18: 1397-1409. 2007.

Collins CA, Olsen I, Zammit PS, Heslop L, Petrie A, Partridge TA, Morgan JE. *Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche*. *Cell*, 122: 289-301. 2005.

Collins CA. *Satellite cell self-renewal*. *Curr Opin Pharmacol*. 6: 301-306. 2006

Comella JX, Sanz-Rodriguez C, Aldea M, Esquerda JE. *Skeletal muscle-derived trophic factors prevent motoneurons from entering an active cell death program in vitro*. *J Neurosci*, 14: 2674-2686. 1994.

Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, Girma ER, Weissman IL, Rando TA. *Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment*. *Nature*, 433: 760-764. 2005.

Cornelison DDW, Wold BJ. *Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells*. *Dev Biol*, 191: 270-283. 1997.

Cornelison DD. *Context matters: in vivo and in vitro influences on muscle satellite cell activity*. *J Cell Biochem*, 105: 663-669. 2008.

- Corona BT, Garg K, Ward CL, McDaniel JS, Walters TJ, Rathbone CR. *Autologous minced muscle grafts: a tissue engineering therapy for the volumetric loss of skeletal muscle*. Am J Physiol Cell Physiol, 305: C761–C775. 2013.
- Cosgrove BD, Sacco A, Gilbert PM, Blau HM. *A home away from home: challenges and opportunities in engineering in vitro muscle satellite cell niches*. Differentiation, 78: 185-194. 2009.
- Cossu G, Molinaro M. *Cell heterogeneity in the myogenic lineage*. Curr Top Dev Biol 23:185–208. 1987.
- Cossu G, Mavilio F. *Myogenic stem cells for the therapy of primary myopathies: wishful thinking or therapeutic perspective?*. J Clin Invest, 105: 1669-1674. 2000
- Cossu G, Biressi S. *Satellite cells, myoblasts and other occasional myogenic progenitors: possible origin, phenotypic features and role in muscle regeneration*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 16: 623-631. 2005.
- Creaney L. *Platelet-rich plasma and the biological complexity of tissue regeneration*. Br J Sports Med, 45: 966-971. 2011.
- Crisan M, Corselli M, Chen WCW, Peault B. *Perivascular cells for regenerative medicine*. J Cell Mol Med, 16: 2851-60. 2012.
- Cullen MJ y Mastaglia F.L. *Pathological reactions of skeletal muscle*. En: Skeletal muscle pathology. Mastaglia F.L. y Walton J. (eds) Churchill Livingstone, Edinburgh. pp 88-139. 1982.
- Cumming WJK, Fulthorpe J, Hudgson P, Mahon M. *Appendices: Electron microscopical procedures*. En: Color Atlas of Muscle Pathology. Mosby Wolfe. London, p.188. 1994.
- Da Silva ME, Peña J. *Mecanismos de formación de nuevas fibras en el músculo esquelético*. Arch Med Dep, 21: 329-336. 2004.
- Danieli-Betto D, Germinario E, Megighian A, Midrio M. *Nerve influence on rat fast-twitch skeletal muscle regeneration*. Basic Appl Myol, 12: 209-217. 2002.
- Darr KC, Schultz E. *Exercise-induced satellite cell activation in growing and mature skeletal muscle*. J Appl Physiol, 63: 1816-1821. 1987.
- Dayanidhi S, Dykstra PB, Lyubasyuk V, McKay BR, Chambers HG, Lieber RL et al. *Reduced satellite cell number in situ in muscular contractures from children with cerebral palsy*. J Orthop Res, 33: 1039-1045. 2015.
- Darabi R, Santos FNC, Perlingeiro RCR. *The therapeutic potencial of embryonic and adult stem cells for skeletal muscle regeneration*. Stem Cell Rev, 4: 217-225. 2008.
- De Angelis L, Berghella L, Coletta M, Lattanzi L, Zanchi M, Cusella-De Angelis MG, Ponzetto C, Cossu G. *Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration*. J Cell Biol, 15: 869-878. 1999.

de Maruenda EC, Franzini-Armstrong C. *Satellite and invasive cells in frog sartorius muscle*. Tissue Cell 10, 749-772. 1978.

Decary S, Hamida CB, Mouly V, Barbet JP, Hentati F, Butler-Browne GS. *Shorter telomeres in dystrophic muscle consistent with extensive regeneration in young children*. Neuromusc Disord, 10:113-120. 2000.

Dedkov EI, Kostrominova TY, Borisov AB, Carlson BM. *Reparative myogenesis in long-term denervated skeletal muscles of adult rats results in a reduction of the satellite cell population*. Anat Rec, 263: 139-154. 2001.

Dedkov EI, Borisov AB, Carlson BM. *Dynamics of postdenervation atrophy of young and old skeletal muscles: Differential responses of fiber types and muscle types*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 58: 984-991. 2003.

Degens H. *The role of systemic inflammation in age-related muscle weakness and wasting*. Scand J Med Sci Sports, 20: 28-38. 2010.

Dellavalle A, Maroli G, Covarello D, Azzoni E, Innocenzi A, Perani L, Antonini S, Sambasivan R, Brunelli S, Tajbakhsh S, Cossu G. *Pericytes resident in postnatal skeletal muscle differentiate into muscle fibres and generate satellite cells*. Nat Commun, 2: e499. 2011

Dellavalle A, Sampaolesi M, Tonlorenzi R, Tagliafico E, Sacchetti B, Perani L, Innocenzi A, Galvez BG, Messina G, Morosetti R, Li S, Belicchi M, Peretti G, Chamberlain JS, Wright WE, Torrente Y, Ferrari S, Bianco P, Cossu G. *Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells*. Nat. Cell Biol. 9, 255-267. 2007.

Dhawan J, Rando TA. *Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment*. Trends Cell Biol, 15: 666-673. 2005.

Diaz-Manera J, Gallardo E, de Luna N, Navas, M, Soria, L, Garibaldi, M, Rojas-Garcia, R. *The increase of pericyte population in human neuromuscular disorders supports their role in muscle regeneration in vivo*. J Pathol. 228: 544-53. 2012

Dilworth FJ, Blais A. *Epigenetic regulation of satellite cell activation during muscle regeneration*. Stem Cell Research & Therapy, 2:1-8. 2011.

Doppler K, Mittelbronn M, Bornemann A. *Myogenesis in human denervated muscle biopsies*. Muscle Nerve, 37: 79-83. 2008.

Dreyer HC, Blanco CE, Sattler FR, Schroeder ET, Wiswell RA. *Satellite cell numbers in young and older men 24 hours after eccentric exercise*. Muscle Nerve, 33: 242-253. 2006.

Dubowitz V, Sewry CA. *Histological and histochemical stains and reactions*. In: Muscle biopsy: A practical approach. Saunders Elsevier. 4th Edition. China. 2007.

Dumont NA, Wang YX, Rudnicki MA. *Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function*. Development, 142: 1572-1581. 2015

Echeverri K, Tanaka EM. *Mechanisms of muscle dedifferentiation during regeneration*. Cell Dev Biol, 13: 353-360. 2002.

Eftimie R, Brenner HR, Buonanno A (1991). *Myogenin and MyoD join a family of skeletal muscle genes regulated by electrical activity*. Proc Natl Acad Sci, 88: 1349-53.

Ehrhardt J, Morgan J. *Regenerative capacity of skeletal muscle*. Current Opinion in Neurology, 18: 548-553. 2005.

Engel AG, Banker BA. *Ultrastructural changes in diseased muscle*. En: Engel A.G., Franzini-Armstrong C. (eds.). *Myology*. Vol I. 3rd edition. New York, McGraw-Hill, pp: 749-887. 2004.

Fardeau M. *Congenital myopathies*. En: Skeletal muscle pathology. Mastaglia F.L. y Walton J. (eds) Churchill Livingstone, Edinburgh. pp 161-203. 1982

Farini A, Razini P, Erratico S, Torrente Y, Meregalli M. *Cell based therapy for Duchenne muscular dystrophy*. J Cell Physiol, 221: 526-534. 2009.

Feldman JL, Stockdale FE. *Skeletal muscle satellite cell diversity: satellite cells form fibers of different types in cell culture*. Dev Biol, 143: 320-334. 1991.

Feldman JL, Stockdale FE. *Temporal appearance of satellite cells during myogenesis*. Dev Biol, 153: 217-226. 1992.

Finkelstein DI, Dooley PC, Luff AR. *Recovery of muscle after different periods of denervation and treatments*. Muscle Nerve, 16: 769-77. 1993.

Freysenet D. *Mécanismes cellulaires et moléculaires du contrôle de la masse musculaire lors d'un entraînement en force*. Science & Sports, 21: 74-79. 2006

Fu X, Wang H, Hu P. *Stem cell activation in skeletal muscle regeneration*. Cell Mol Life Sci. 72: 1663-1677. 2015.

Gayraud-Morel, Chrétien F, Tajbakhsh S. *Skeletal muscle as a paradigm for regenerative biology and medicine*. Regen Med, 4: 293-319. 2009.

Gibson MC, Schultz E. *The distribution of satellite cells and their relationship to specific fibre types in soleus and extensor digitorum longus muscles*. Anat Rec 202: 329-337. 1982

Giovanetti-González R, Agüera E., Ruz-Caracuel I, Jimena I, Luque E. Martínez A, Peña J. *Muscle extracts lead to increased pericytes in normal soleus muscle of C57B/L6 mouse. In writing 2017.*

Goding GS Jr, Al-Sharif KI, McLoon LK. *Myonuclear addition to uninjured laryngeal myofibers in adult rabbits.* Ann Otol Rhinol Laryngol. 114: 552-557. 2005.

Gordon T, Putman CT, Hegedus J. *Amyotrophic lateral sclerosis: Evidence of early denervation of fast-twitch muscles.* Basic Appl. Myol. 17: 141-145. 2007.

Gori Z, Tangheroni W, Cao A. *Ultrastructural features of the muscle fibers in congenital hypothyroidism.* Virchows Arch Abt A Path Anat, 354: 223-238. 1971.

Gorza L, Gundersen K Lomo T, Schiaffino S, Westgaard RH. *Slow-to-fast transformation of denervated soleus muscles by chronic high frequency stimulation in the rat.* J Physiol, 402: 627-649. 1988.

Grounds MD, McGeachie JK, Davies MJ, Sorokin L, Maley MAL. *The expression of extracellular matrix during adult skeletal muscle regeneration: how the basement membrane, interstitium, and myogenic cells collaborate.* Basic Appl Myol, 8: 129-141. 1998.

Grounds M. *Muscle regeneration: molecular aspects and therapeutic implications.* Current Opin Neurol, 12: 535-543. 1999

Grounds MD. *Muscling in on tissue engineering.* Life Sci, 12: 336-40. 2000.

Grounds MD, White JD, Rosenthal N, Bogoyevitch MA. *The role of stem cells in skeletal and cardiac muscle repair.* J Histochem Cytochem, 50: 589-610. 2002.

Grounds MD, Davies KE. *The allure of stem cell therapy for muscular dystrophy.* Neuromuscular Disorders 17: 206–208. 2007.

Grounds MD, Relaix F. *Myogenic precursor cells.* In: Disorders of Voluntary Muscle, (Eds. George Karpati, David Hilton-Jones, Kate Bushby and Robert C. Griggs). 8th edn., Cambridge University Press, pp. 20-36. 2009.

Grounds MD. *The need to more precisely define aspects of skeletal muscle regeneration.* Int J Biochem Cell Biol 56: 56-65. 2014.

Guettier-Sigrist S, Hugel B, Coupin G, Freyssinet JM, Poidron P, warter JM. *Possible pathogenic role of muscle cell dysfunction in motor neuron death in spinal muscular atrophy.* Muscle Nerve, 25: 700-708. 2002.

Gundersen K, Bruusgaard JC. *Nuclear domains during muscle atrophy: nuclei lost or paradigm lost?* J Physiol. 2008;586(Pt 11):2675-81.

Hansen-Smith FM, Picou D, Golden MH. *Muscle satellite cells in malnourished and nutritionally rehabilitated children.* J. Neurol Sci, 41: 207-221. 1979.

- Harris JB, Johnson MA. *Further observations on the pathological responses of rat skeletal muscle to toxins isolated from the venom of the Australian tiger snake *Notechis scutatus scutatus**. Clin Exp Pharmacol Physiol, 5: 587-600. 1978.
- Hawke TJ. *Muscle stem cells and exercise training*. Exercise & Sport Sciences Reviews, 33: 63-68. 2005.
- Hawke TJ, Garry DJ. *Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology*. J Appl Physiol, 91: 534-551. 2001.
- Haugk KL, Roeder RA, Garber MJ, Schelling GT. *Regulation of muscle cell proliferation by extracts from crushed muscle*. J Anim Sci, 73: 1972-1981. 1995.
- Haugk KL, Roeder RA, Garber MJ, Quinn LS. *Crushed muscle extracts: a model system to investigate growth factor regulation of satellite cell activities in meat animals*. Basic Appl Myol, 6: 163-173. 1996.
- Heimann P, Menke A, Rothkegel B, Jockusch H. *Overshooting production of satellite cells in murine skeletal muscle affected by the mutation "muscular dystrophy with myositis" (mdm, Chr 2)*. Cell Tissue Res, 283: 435-441. 1996.
- Henderson CE, Huchet M, Changeux JP. *Denervation increases a neurite-promoting activity in extracts of skeletal muscle*. Nature, 302: 609-611. 1983.
- Heslop L, Morgan JE, Partridge TA. *Evidence for a myogenic stem cell that is exhausted in dystrophic muscle*. J Cell Sci, 113:2299-2308. 2000.
- Holterman CE, Rudnicki MA. *Molecular regulation of satellite cell function*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 16:575-584. 2005.
- Houenou LJ, McManaman JL, Prevette D, Oppenheim RW. *Regulation of putative muscle-derived neurotrophic factors by muscle activity and innervation: in vivo and in vitro studies*. J Neurosci, 11: 2829-2837. 1991.
- Hughes SM, Taylor JM, Tapscott SJ, Gurley CM, Carter WJ, Petersen ChA. *Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones*. Development, 118: 1137-1147. 1993.
- Hughes SM, Koishi K, Rudnicki M, Maggs AM. *MyoD protein is differentially accumulated in fast and slow skeletal muscle fibres and required for normal fibre type balance in rodents*. Mech Dev, 61: 151-163. 1997.
- Hurme T, Kalimo H, Lehto M, Järvinen M. *Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study*. Med Sci Sports Exerc, 23: 801-810. 1991.
- Hyatt JP, Roy RR, Baldwin KM, Edgerton VR. *Nerve activity-independent regulation of skeletal muscle atrophy: Role of myod and myogenin in satellite cells and myonuclei*. Am J Physiol Cell Physiol, 285: C1161-1173. 2003.
- Hyatt JP, Roy RR, Baldwin KM, Wernig A, Edgerton VR. *Activity-unrelated neural control of myogenic factors in a slow muscle*. Muscle Nerve, 33: 49-60. 2006.

- Ichim TE, Alexandrescu DT, Solano F, Lara F, Campion RDN, Paris E, Woods EJ, Murphy MP, Dasanu CA, Patel AN, Marleau AM, Leal A, Riordan NH. *Mesenchymal stem cells as anti-inflammatories: implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy*. Cellular Immunology, 260: 75-82. 2010
- Ishido M, Kami K, Masuhara M. *In vivo expression patterns of MyoD, p21, and Rb proteins in myonuclei and satellite cells of denervated rat skeletal muscle*. Am J Physiol Cell Physiol. 2004;287(2):C484-93.
- Jackson JR, Kirby TJ, Fry CS, Cooper RL, McCarthy JJ, Peterson CA, Dupont-Versteegden EE. *Reduced voluntary running performance is associated with impaired coordination as a result of muscle satellite cell depletion in adult mice*. Skeletal Muscle 5:e41. 2015
- Jejurikar SS, Kuzon Jr. *Satellite cell depletion in degenerative skeletal muscle*. Apoptosis, 8: 573-578. 2003.
- Järvinen TAH, Järvinen TLN, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M. *Muscle injuries. Biology and treatment*. Am J Sports Med, 33: 745-764. 2005.
- Järvinen TAH, Järvinen TLN, Kääriäinen M, Äärimaa V, Vaittinen S, Kalimo H, Järvinen M. *Muscle injuries: optimising recovery*. Best Practice & Research Clinical Rheumatology, 21:317-331. 2007.
- Jennische E, Skottner A, Hansson HA. *Satellite cells express the trophic factor IGF-I in regenerating skeletal muscle*. Acta Physiol Scand, 129: 9-15. 1987.
- Jimena I, Peña J, Luque E, Vaamonde R. *Muscle hypertrophy experimentally induced by administration of denervated muscle extract*. J Neuropathol Exp Neurol, 52: 379-386. 1993.
- Jimena I, Peña J, Luque E, Ayuso F, Vaamonde R. *Myotrophic effects of muscle extracts obtained at different intervals after denervation*. Neuropathol Appl Neurobiol, 24: 217-223. 1998.
- Jimena I, Tasset I, López-Martos R, Rubio AJ, Luque E, Montilla P, Peña J, Túnez I. *Effects of magnetic stimulation on oxidative stress and skeletal muscle regeneration induced by mepivacaine in rat*. Medicinal Chemistry, 5: 44-49. 2009.
- Johnson SE, Allen RE. *Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is expressed in activated rat skeletal muscle satellite cells*. J Cell Physiol, 154: 29-43. 1993.
- Jouvion G, Rouger K, Fornasari B, Bougras G, Leroux I, Segalen J, Cherel Y. *Functional properties of muscle-derived cells related to morphological characteristics*. Histochem Cell Biol, 126: 603-616. 2006.
- Józsa L, Kannus P, Thöring J, Reffy A, Järvinen M, Kvist M. *The effect of tenotomy and immobilisation on intramuscular connective tissue*. J Bone Joint Surg (Br) 72-B: 293-297, 1990.

- Kadi F, Schjerling P, Andersen LL, Charifi N, Madsen JL, Christensen LR, Andersen JL. *The effects of heavy resistance training and detraining on satellite cells in human skeletal muscles*. J Physiol, 558:1005–1012. 2004
- Kadi F, Ponsot E. *The biology of satellite cells and telomeres in human skeletal muscle: effects of aging and physical activity*. Scand J Med Sci Sports, 20: 39-48. 2010.
- Kasemkijwattana C, Menetrey J, Bosch P, Somogyi G, Moreland MS, Fu FH, Buranapanitkit B, Watkins SS, Huard J. *Use of growth factors to improve muscle healing after strain injury*. Clin Orthopa Relat Res, 370: 272-285. 2000.
- Kawesa S, Vanstone J, Tsilfidis C. *A differential response to newt regeneration extract by C2C12 and primary mammalian muscle cells*. Skeletal Muscle, 5: e19. 2015
- Kelly AM. *Perisynaptic satellite cells in the developing and mature rat soleus muscle*. Anat Rec, 190: 891-904. 1978.
- Kennedy JM, Eisenberg BR, Reid SK, Sweeney LJ, Zak R. *Nascent muscle fiber appearance in overloaded chicken slow-tonic muscle*. Am J Anat, 181: 203-215. 1988.
- Kennedy JM, Sweeney LJ, Gao L. *Ventricular myosin expression in developing and regenerating muscle, cultured myotubes, and nascent myofibers of overloaded muscle in the chicken*. Med Sci Sports Exerc, 21:S187-S189. 1989.
- Kim J, Braun T. *Skeletal muscle stem cells for muscle regeneration*. Methods Mol Biol, 1213: 245-53. 2014.
- Kinney MC, Dayanidhi S, Dykstra PB, McCarthy JJ, Peterson CA, Lieber RL. *Reduced skeletal muscle satellite cell number alters muscle morphology after chronic stretch but allows limited serial sarcomere addition*. Muscle Nerve, 55: 384-390. 2017
- Kitajima Y, Ogawa S, Ono Y. *Visualizing the functional heterogeneity of muscle stem cells*. Methods Mol Biol. 1516: 183-193. 2016
- Klinkerfuss GH. *An electron microscopic study of myotonic dystrophy*. Arch Neurol, 16: 181-193. 1967.
- Knudsen A. B., Larsen M., Mackey A.L., Hjort M., Hansen K.K., Qvortrup K., Kjaer M., Krogsgaard M.R. *The human myotendinous junction: An ultrastructural and 3D analysis study*. Scand J Med Sci Sports, 25: e116–e123. 2015.
- Komulainen J, Kalliokoski R, Koskinen SO, Drost MR, Kuipers H, Hesselink MK. *Controlled lengthening or shortening contraction-induced damage is followed by fiber hypertrophy in rat skeletal muscle*. Int J Sports Med, 21: 107-112. 2000.
- Koning M, Harmsen M, van Luyn MJA, Werker PMN. *Current opportunities and challenges in skeletal muscle tissue engineering*. J Tissue Eng Regen Med, 3: 407-415. 2009.

Kostallari E, Baba-Amer Y, Alonso-Martin S, Ngoh P, Relaix F, Lafuste P, Gherardi RK. *Pericytes in the myovascular niche promote post-natal myofiber growth and satellite cell quiescence*. Development, 142: 1242-53. 2015.

Kuang S, Rudnicki MA. *The emerging biology of satellite cells and their therapeutic potential*. Cell, 14: 82-91. 2008.

Kuang S, Chargé SB, Seale P, Huh M, Rudnicki MA. *Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis*. J Cell Biol, 172: 103-113. 2006.

Kuang S, Kuroda K, Le Grand F, Rudnicki MA. *Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle*. Cell, 129: 999-1010. 2007

Kubinova L, Janacek J, Ribaric S, Cebasek V Erzen I. *Three-dimensional study of the capillary supply of skeletal muscle fibres using confocal microscopy*. J Muscle Res Cell Motil, 22: 217-227. 2001.

Kula RW, Shafiq SA, Sher JH, Qazi QH. *I-Cell disease (Mucopolipidosis II). Differential expression in satellite cells and mature muscle fibers*. J Neurol Sci, 63: 75-84. 1984.

Kuschel R, Yablonka-Reuveni Z, Bornemann A. *Satellite cells on isolated myofibers from normal and denervated adult rat muscle*. J Histochem Cytochem, 47: 1375-1383. 1999

Laguens R. *Satellite cells of skeletal muscle fibers in human progressive muscular dystrophy*. Virchows Arch Path Anat, 336: 564-569. 1963.

Lagord C, Soulet L, Bonavaud S, Bassaglia Y, Rey C, Barlovatz-Meimon G, Gautron J, Martelly I. *Differential myogenicity of satellite cells isolated from extensor digitorum longus (EDL) and soleus rat muscles revealed in vitro*. Cell Tissue Res, 291: 455-468. 1998.

LaFramboise WA, Guthrie RD, Scalise D, Elborne V, Bombach KL, Armanious CS, Magovern JA. *Effect of muscle origin and phenotype on satellite cell muscle-specific gene expression*. J Mol Cell Cardiol, 35: 1307-1318. 2003.

Lamey TM, Koenders A, Ziman M. *Pax genes in myogenesis: alternate transcripts add complexity*. Histol Histopathol, 19: 1289-1300. 2004.

Lancioni H, Lucentini L, Palomba A, Fulle S, Micheli MR, Panara F. *Muscle actin isoforms are differentially expressed in human satellite cells isolated from donors of different ages*. Cell Biol Int, 31: 180-85. 2007.

Laumonier T, Menetrey J. *Muscle injuries and strategies for improving their repair*. J Exp Orthop, 3: e15. 2016

Laule S., Bornemann A. *Ultrastructural findings at the satellite cell-myofiber border in normal and diseased human muscle biopsy specimens*. Acta Neuropathol 101: 435-439. 2001

Lawson-Smith MJ, McGeachie JK. *The identification of myogenic cells in skeletal muscle, with emphasis on the use of tritiated thymidine autoradiography and desmin antibodies.* J Anat, 192: 161-71. 1998.

Le Grand F, Rudnicki. *Satellite and stem cells in muscle growth and repair.* Development, 134: 3953-3957. 2007.

Legerlotz K, Smith HK. *Role of MyoD in denervated, disused, and exercise muscle.* Muscle Nerve, 38: 1087-1100. 2008.

Li M, Chan K, Cai D, Leung P, Cheng C, Lee K, Lee KK. *Identification and purification of a intrinsic human muscle myogenic factor that enhances muscle repair and regeneration.* Arch Biochem Biophys, 384: 263-268. 2000.

Li Y, Cummins J, Huard J. *Muscle injury and repair.* Curr Opin Orthop, 12: 409-415. 2001.

Lu DX, Huang SK, Carlson BM. *Electron microscopy study of long-term denervated rat skeletal muscle.* Anat Rec, 248: 355-365. 1997.

Luque E, Peña J, Salas P, Jimena I, Martín JD. *Changes in satellite cell population associated with regenerating muscle fibers in rats.* J Submicrosc Cytol Pathol, 28: 305-311. 1996.

Luque E, Mata F., Jimena I, Peña J. *Papel de la célula satélite en la adaptación tisular del músculo esquelético al ejercicio.* En: La actividad física, la salud y el alto rendimiento. (M. Guillén del Castillo. Coord.). Servicio de Publicaciones. Universidad de Córdoba, pp. 15-28. 2011.

Luque E, Ruz-Caracuel I, Medina FJ, Leiva-Cepas F, Agüera E, Sanchez-Lopez F, Lillo R, Aguilar-Luque M, Jimena I, Tunez I, Pena J. *Skeletal muscle findings in experimental autoimmune encephalomyelitis.* Pathol. Res. Pract. 211: 493-504. 2015.

Lynch GS. *Therapies for improving muscle function in neuromuscular disorders.* Exerc Sport Sci Rev, 29: 141-148. 2001.

Lynch GS, Schertzer JD, Ryall JG. *Therapeutic approaches for muscle wasting disorders.* Pharmacol Therapeut, 113: 461-487. 2007.

Machida S, Booth FW. *Regrowth of skeletal muscle atrophied from inactivity.* Med Sci Sports Exerc, 36: 52-59. 2004.

Machingal MA, Corona BT, Walters TJ, Kesireddy V, Koval CN, Dannahower A, Zhao W, Yoo JJ, Christ GJ. *A tissue-engineered muscle repair construct for functional restoration of an irrecoverable muscle injury in a murine model.* Tissue Eng Part A, 17/18: 2291-2303. 2011.

- Magaudda L, Di Mauro D, Trimarchi F, Anastasi G. *Effects of physical exercise on skeletal muscle fiber: ultrastructural and molecular aspects*. Basic Appl Myol. 14: 17-21. 2004.
- Maier A, Zhou Z, Bornemann A. *The expression profile of myogenic transcription factors in satellite cells from denervated rat muscle*. Brain Pathol, 12: 170-177. 2002
- Macpherson PC, Wang X, Goldman D. *Myogenin regulates denervation-dependent muscle atrophy in mouse soleus muscle*. J Cell Biochem, 112: 2149-2159. 2011.
- Magnusson C, Svensson A, Christerson U, Tagerud S. *Denervation-induced alterations in gene expression in mouse skeletal muscle*. Eur J Neurosci, 21: 577-580. 2005.
- Maltin CHA, Harris JB, Cullen MJ. *Regeneration of mammalian skeletal muscle following the injection of the snake-venom toxin, taipoxin*. Cell Tissue Res, 232: 565-577. 1983.
- Matsuoka Y, Inoue A. *Controlled differentiation of myoblast cells into fast and slow muscle fibers*. Cell Tissue Res, 332:123–132. 2008.
- Martin D, Merkel E, Tucker KK, McManaman JL, Albert D, Relton J, Russell DA. *Cachectic effect of ciliary neurotrophic factor on innervated skeletal muscle*. Am J Physiol. 271: R1422-1428. 1996.
- Matsuda R, Spector DH, Strohman RC. *Regenerating adult chicken skeletal muscle and satellite cell cultures express embryonic patterns of myosin and tropomyosin isoforms*. Dev Biol 100: 478-488. 1983.
- McCarthy JJ, Mula J, Miyazaki M, Erfani R, Garrison K, Farooqui AB, Srikuea R, Lawson BA, Grimes B, Keller C, Van Zant G, Campbell KS, Esser KA, Dupont-Versteegden EE, Peterson CA. *Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle*. Development, 138:3657-3666. 2011.
- McCormick KM, Schultz E. *Mechanisms of nascent fiber formation during avian skeletal muscle hypertrophy*. Dev Biol, 150: 319-334. 1992.
- McCullagh KJA, Perlingeiro RCR. *Coaxing stem cells for skeletal muscle repair*. Adv Drug Deliv Rev, 84: 198-207. 2015.
- McGann CJ, Odelberg SJ, Keating MT. *Mammalian myotube dedifferentiation induced by newt regeneration extract*. Proc Natl Acad Sci USA, 98: 13699-13704. 2001.
- McLennan IS. *Neurogenic and myogenic regulation of skeletal muscle formation: a critical re-evaluation*. Prog Neurobiol, 44: 119-140. 1994.

- McFarland DC, Pesall JE, Gilkerson KK. *The influence of growth factors on turkey embryonic myoblasts and satellite cells in vitro*. Gen Comp Endocrinol, 89:415–424. 1993
- McFarland DC, Pesall JE, Gilkerson KK, Ferrin NH. *The response to growth factors of cultured satellite cells derived from turkeys having different growth rates*. Cytobios 82:229–238. 1995.
- McLoon LK, Thorstenson KM, Solomon A, Lewis MP. *Myogenic precursor cells in craneofacial muscles*. Oral Dis, 13: 134-140. 2007.
- Megighian A, Germinario E, Rossini K, Midrio M, Danielli-Betto D. *Nerve control of type 2A MHC isoform expression in regenerating slow skeletal muscle*. Muscle Nerve, 24: 47-53. 2001.
- Melone MAB, Peeluso G, Petillo O, Galderisi U, Cotufro R. *Defective growth in vitro of Duchenne muscular dystrophy myoblasts: the molecular and biochemical basis*. J. Cell Biochem, 76: 118-132. 1999.
- Menasché P. *Skeletal muscle satellite cell transplantation*. Cardiovascular Research, 58 : 351-357. 2003.
- Mendler L, Zador E, Dux L, Wuytack F. *mRNA levels of myogenic regulatory factors in rat slow and fast muscles regenerating from notexin-induced necrosis*. Neuromusc Disord, 8: 533-541. 1998.
- Molnar G, Ho ML, Schroedl NA. *Evidence for multiple satellite cell populations and a non-myogenic cell type that is regulated differently in regenerating and growing skeletal muscle*. Tissue Cell, 28:547–556. 1996.
- Mong FS. *Satellite cells in the regenerated and regrafted skeletal muscles of rats*. Experientia, 44: 601-603. 1988.
- Mounier R, Chrétien F, Chazaud B. *Blood Vessels and the Satellite Cell Niche*. In: Current Topics in Developmental Biology, Elsevier Inc. 96: 121-138. 2011.
- Mourkioti F, Rosenthal N. *IGF-1, inflammation and stem cells: interactions during muscle regeneration*. Trends Immunol, 26: 535-542. 2005.
- Morgan JE, Partridge TA. *Muscle satellite cells*. Int J Biochem Cell Biol, 35: 1151-1156. 2003.
- Moss FP, Leblond CP. *Satellite cells as a source of nuclei of growing rats*. Anat Rec, 170: 421-436. 1971.
- Motohashi N, Asakura A. *Muscle satellite cell heterogeneity and self-renewal*. Front Cell Dev Biol, 2: e1. 2014.
- Muntoni F, Brown S, Cegri C, Patel K. *Muscle development genes: their relevance in neuromuscular disorders*. Neuromuscular Disord, 12: 438-446. 2002.

Murphy MM, Lawson JA, Mathew SJ, Hutcheson DA, Kardon G. *Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration*. Development, 138: 3625-3637. 2011

Murray MA, Robbins N. *Cell proliferation in denervated muscle: time course, distribution and relation to disuse*. Neuroscience, 7: 1817-1822. 1982

Nakae Y, Stoward PJ, Shono M, Matsuzaki T. *Most apoptotic cells in mdx diaphragm muscle contain accumulated lipofuscin*. Histochem Cell Biol 115: 205-214. 2001.

Negrone E, Butler-Browne GS, Mouly V. *Myogenic stem cells: regeneration and cell therapy in human skeletal muscle*. Pathol Biol, 54: 100-108. 2006

Nishimune H, Oishi I, Koyanagi S, Taguchi T. *Neurite outgrowth-promoting factors in extracts of denervated chick skeletal muscle*. Cell Mol Neurobiol, 18: 391-398. 1998.

Nonaka I, Tojo M. *Fetal muscle characteristics in nemaline myopathy*. Neuropediatrics, 14: 47-52. 1983.

Okano T, Matsuda T. *Tissue engineered skeletal muscle: preparation of highly dense, highly orientated hybrid muscular tissue*. Cell Transplant, 7: 71-82. 1998.

Ontell M. *Evidence for myoblastic potential of satellite cells in denervated muscle*. Cell Tissue Res, 160: 345-353. 1975.

Ontell M. *Muscular dystrophy and muscle regeneration*. Hum Pathol, 17: 673-682. 1986.

Ono Y, Boldrin L, Knopp P, Morgan JE, Zammit PS. *Muscle satellite cells are a functionally heterogeneous population in both somite-derived and branchiomeric muscles*. Dev Biol, 337: 29-41. 2010.

Otto A, Collins-Hooper H, Patel K. *The origin, molecular regulation and therapeutic potential of myogenic stem cells*. J Anat, 215: 477-497. 2009.

Pallafacchina G, Blaauw B, Schiaffino S. *Role of satellite cells in muscle growth and maintenance of muscle mass*. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 1: S12-18. 2013.

Partridge TA, Morgan JE, Coulton GR, Hoffman EP, Kunkel LM. *Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to dystrophin-positive by injection of normal myoblast*. Nature, 337: 176-179. 1989.

Partridge TA. *The role of satellite cells and circulating stem cells in regeneration of skeletal muscle*. Basic Appl Myol, 13: 277-280. 2003a.

Partridge TA. *Stem cell route to neuromuscular therapies*. Muscle Nerve, 27: 133-141. 2003b.

- Passipieri JA, Christ GJ. *The Potential of Combination Therapeutics for More Complete Repair of Volumetric Muscle Loss Injuries: The Role of Exogenous Growth Factors and/or Progenitor Cells in Implantable Skeletal Muscle Tissue Engineering Technologies*. Cells Tissues Organs. 202(3-4): 202-213. 2016
- Pawlikowski B, Pulliam C, Dalla Betta N, Kardon G, Olwin BB. *Pervasive satellite cell contribution to uninjured adult muscle fibers*. Skelet Muscle, 5: e42. 2015
- Peault B, Rudnicki M, Torrente Y, , Cossu G, Tremblay JP, Partridge T, Gussoni E, Kunkel LM, Huard J. *Stem and progenitors cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy*. Mol Ther, 15: 867-877. 2007.
- Peng H, Huard J. *Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair*. Transpl Immunol. 2004;12(3-4):311-9.
- Peña J. *¿Puede ser estimulada la regeneración del músculo esquelético?* Histol Med, 3: 195-198. 1987.
- Peña J, Luque E, Vaamonde R. *Estudio experimental de la miopatía por ejercicio*. Neurología, 2: 32-42. 1987.
- Peña J, Aranda C, Luque E, Vaamonde R. *Heroin-induced myopathy in rat skeletal muscle*. Acta Neuropathol (Berl.), 80: 72-76. 1990.
- Peña J, Jimena I, Luque E, Vaamonde R. *New fiber formation in rat soleus muscle following administration of denervated muscle extract*. J Neurol Sci, 128: 14-21. 1995.
- Peña J, Luque E, Noguera F, Jimena I, Vaamonde R. *Experimental induction of ring fibers in regenerating skeletal muscle*. Pathol Res Pract, 197: 21-27. 2001
- Peña J, Luque E, Jimena I, Noguera F, Castilla S, Vaamonde R. *Abnormalities in tenectomized muscle fiber repair*. Eur J Anat, 11: 37-45. 2007.
- Peña J, Jimena I. *Avances en el proceso de la regeneración muscular*. En: VI Curso de Medicina y Traumatología del Deporte (F. Jiménez-Díaz y A. Caballero, Coord.). Quaderna Editorial, Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, pp. 127-144. 2008.
- Pette D, Sketelj J, Škorjanc D, Leisner E, Traub I, Bajrovic F. *Partial fast-to-slow conversion of regenerating rat fast-twitch muscle by chronic low-frequency stimulation*. J Muscle Res Cell Motil, 23: 215-221. 2002.
- Pradat PF, Barani A, Wanschitz J, Dubourg O, Lombès A, Bigot A, Mouly V, Bruneteau G, Salachas F, Lenglet T, Meininger V, Butler-Browne G. *Abnormalities of satellite cells function in amyotrophic lateral sclerosis*. Amyotrophic Lateral Sclerosis, 00: 1-8. 2011.
- Price FD, Kuroda K, Rudnicki MA. *Stem cell based therapies to treat muscular dystrophy*. BBA-Molecular Basis of Disease, 1772: 272-283. 2007
- Randolph ME, Pavlath GK. *A muscle stem cell for every muscle: variability of satellite cell biology among different muscle groups*. Front Aging Neurosci, 7:e190. 2015.

Rantanen J, Hurme T, Lukka R, Heino J, Kalimo H. *Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells*. Lab Invest, 72: 341-347. 1995.

Reger JF, Craig A.S. *Studies on the fine structure of muscle fibers and associated satellite cells in hypertrophic human deltoid muscle*. Anat Rec, 162: 483-500. 1968.

Relaix F, Zammit PS. *Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage*. Development. 139: 2845-2856. 2012.

Reimann J, Brimah K, Schröder R, Werning A, Beauchamp JR, Partridge TA. *Pax7 distribution in human skeletal muscle biopsies and myogenic tissue cultures*. Cell Tissue Res, 315: 233-242. 2004.

Renault V, Thornell LE, Butler-Browne G, Mouly V. *Human skeletal muscle satellite cells: aging, oxidative stress and the mitotic clock*. Exp Gerontol, 37: 1229-1236. 2002a

Renault V, Thornell LE, Ericksson PO, Butler-Browne GS, Mouly V. *Regenerative potential of human skeletal muscle during aging*. Aging Cell, 1: 132-139. 2002b.

Renault V, Rolland E, Thornell LE, Mouly V, Butler-Browne G. *Distribution of satellite cells in the human vastus lateralis muscle during aging*. Exp Gerontol, 37: 1511-1512. 2002c.

Rinaldi F, Perlingeiro RCR. *Stem cells for skeletal muscle regeneration: therapeutic potential and roadblocks*. Transl Res, 163: 409-417. 2014.

Rodrigues Ade C, Schmalbruch H. *Satellite cells and myonuclei in long-term denervated rat muscles*. Anat Rec, 243: 430-437. 1995.

Roth SM, Martel GF, Ivey FM, Lemmer JT, Tracy BL, Metter EJ, Hurley BF, Rogers MA. *Skeletal muscle satellite cell characteristics in young and older men and women after heavy resistance strength training*. J Gerontol Biol Sci, 56: 240-247. 2000.

Ruz-Caracuel I, Leiva- Cepas F, Luque E, Jimena I, Peña J. *Relaciones entre capilares, fibras musculares esqueléticas y células satélites durante la regeneración*. Actual Med, 98: 27-32. 2013.

Sakuma K, Watanabe K, Sano M, Uramoto I, Sakamoto K, Totsuka T. *The adaptive response of myod family proteins in overloaded, regenerating and denervated rat muscles*. Biochim Biophys Acta 1428: 284-292. 1999.

Salminen A, Vihko V. *Susceptibility of mouse skeletal muscles to exercise injuries*. Muscle Nerve, 6: 596-601. 1983.

Sandri M, Minetti C, Pedemonte M, Carraro U. *Apoptotic myonuclei in human Duchenne muscular dystrophy*. Lab Inv, 78: 1005-1016. 1998.

Santa Maria L, Rojas CV, Minguell JJ. *Signals from damaged but not undamaged skeletal muscle induce myogenic differentiation of rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells*. Exp Cell Res, 300: 418-426. 2004.

Sarnat HB. *Muscle pathology and histochemistry*. American Society of Clinical Pathologist Press. Chicago. 1983

Sarnat HB. *Myotubular myopathy: arrest of morphogenesis of myofibres associated with persistence of fetal vimentin and desmin*. Can J Sci Neurol. 17: 109-123. 1990.

Schaaf GJ, van Gestel TJM, Brusse E, Verdijk RM, de Coo IFM, van Doorn PA, van der Ploeg AT, Pijnappel WWP. *Lack of robust satellite cell activation and muscle regeneration during the progression of Pompe disease*. Acta Neuropathol Commun, 3: e65. 2015.

Schindeler A, Renjing L, Little DG. *The contribution of different cell lineages to bone repair: Exploring a role for muscle stem cells*. Differentiation, 77: 12-18. 2009.

Schmalbruch H, Hellhammer U. *The number of satellite cells in normal human muscle*. Anat Rec, 183: 279-288. 1976.

Schmalbruch H, Hellhammer U. *The number of nuclei in adult rat rat muscles with special reference to satellite cells*. Anat Rec 189: 169-1175. 1977.

Schmalbruch H. *Growth and denervation response of skeletal muscle fibers of newborn rats*. Muscle Nerve, 13: 421-432. 1990.

Schmalbruch H, Lewis DM. *A comparison of the morphology of denervated with aneurally regenerated soleus muscle of rat*. J Muscle Res Cell Motil. 15: 256-266. 1994.

Schmalbruch H, Lewis DM. *Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles*. Muscle Nerve, 23: 617-626. 2000.

Schultz E. *Fine structure of satellite cells in growing skeletal muscle*. Am J Anat, 147: 49-70. 1976.

Schultz E. *Changes in the satellite cells of growing following denervation*. Anat Rec, 190: 299-311. 1978.

Schultz E. *Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles*. Dev Biol 175:84-94. 1996

Schultz E. *Satellite cell behaviour during skeletal muscle growth and regeneration*. Med Sci sports Exerc, 21: 51181-5186. 1989.

Schultz E, Jaryszak DL. *Effects of skeletal muscle regeneration on the proliferation potential of satellite cells*. Mech Ageing Dev, 30: 63-72. 1985.

Schultz E, Lipton BH. *Skeletal muscle satellite cells: changes in proliferation potential as a function of age*. Mech Ageing Dev, 20:377–383.1982

Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA. *PAX7 is required for the specification of myogenic satellite cells*. Cell, 102: 777-786. 2000.

Shavlakadze T, McGeachie J, Grounds MD. *Delayed but excellent myogenic stem cell response of regenerating geriatric skeletal muscles in mice*. Biogerontology, 11:363-376. 2010.

Sherwood RI, Wagers AJ. *Harnessing the potential of myogenic satellite cells*. Trends Mol Med, 12: 189-192. 2006

Shortreed K, Johnston A, Hawke TJ. *Satellite cells and muscle repair*. En: Tiidus PM (ed). Skeletal muscle damage and repair. Human Kinetics, pp: 77-88. 2008.

Shy X, Garry DJ. *Muscle stem cells in development, regeneration, and disease*. Genes Dev, 20: 1692-1708. 2006.

Skuk D, Vilquin JT, Tremblay JP. *Experimental and therapeutic approaches to muscular dystrophies*. Curr Opin Neurol, 15: 563-569. 2002.

Smith LR, Chambers HG, Lieber RL. *Reduced satellite cell population may lead to contractures in children with cerebral palsy*. Dev Med Child Neurol, 55: 264-270. 2013.

Soukop T, Thornell LE. *Expression of myosin heavy chain isoforms in regenerated muscle spindle fibres after muscle grafting in young and adult rats - plasticity of intrafusal satellite cells*. Differentiation, 62: 179-186.1997.

Stedman HH, Sweeney HL, Shrager JB, Maguire HC, Panettieri RA, Petrof B, et al. *The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy*. Nature, 352:536 –539. 1991.

Stern MM, Myers RL, Hammam N, Stern KA, Eberli D, Kritchinsky SB, Soker S, Van Dyke M. *The influence of extracellular matrix derived from skeletal muscle tissue on the proliferation and differentiation of myogenic progenitor cells ex vivo*. Biomaterials, 30: 2393-2399. 2009.

Summers PJ, Ashmore CR, Lee YB, Ellis S. *Stretch-induced growth in chicken wing muscle: role of soluble growth-promoting factors*. J Cell Physiol, 125: 288-294. 1985.

Swash M, Schwartz MS, Sargeant MK. *Pathogenesis of longitudinal splitting of muscle fibres in neurogenic disorders and in polymyositis*. Neuropathol Appl Neurobiol, 4: 99-115. 1978.

Tamaki T, Akatsuka A, Ando K, Nakamura Y, Matsuzawa H, Hotta T, et al. *Identification of myogenic-endothelial progenitor cells in the interstitial spaces of skeletal muscle*. J Cell Biol, 157: 571-577. 2002

Tamaki T, Akatsuka A, Yoshimura S, Roy RR, Edgerton VR. *New fiber formation in the interstitial spaces of rat skeletal muscle during postnatal growth*. J Histochem Cytochem, 50:1097-1111. 2002

Tanzi MC, Farè S, Draghi L, Altomare L. *Scaffolds for muscle tissue engineering*. Basic Appl Myol, 16: 117-118. 2006.

Tajbakhsh S, Relaix F. *Du développement à la régénération du muscle squelettique*. Biofutur, 321: 50-52. 2011

Tatsumi R, Anderson JE, Nevoret CJ, Halevy O, Allen RE. *HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells*. Dev Biol, 194: 114-128. 1998.

Tedesco FS, Dellavalle A, Díaz-Manera J, Messina J, Cossu G. *Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells*. J Clin Invest, 120: 11-19. 2010.

Terasawa K. *Muscle regeneration and satellite cells in Fukuyama type congenital muscular dystrophy*. Muscle Nerve, 9: 465-470. 1986.

Tews DS. *Apoptosis and muscle fibre loss in neuromuscular disorders*. Neuromuscular Disord, 12: 613-622. 2002.

Thomas PE, Ranatunga KW. *Factors affecting muscle fibers transformation in cross-reinnervated muscle*. Muscle Nerve, 16: 193-199. 1993.

Thornell L-E, Lindström M, Renault V., Mouly V., Butler-Browne GS. *Satellite cells and training in the elderly*. Scand J Med Sci Sports 13: 48-55. 2003.

Thornell LE, Lindström M, Renault V, Klein A, Mouly V, Ansved T, Butler-Browne G, Furling D. *Satellite cell dysfunction contributes to the progressive muscle atrophy in myotonic dystrophy type 1*. Neuropathol Appl Neurobiol, 35: 603-613. 2009.

Toigo M, Boutellier, U. *New fundamental resistance exercise determinants of molecular and cellular muscle adaptations*. Eur J Appl Physiol, 97: 643-663. 2006

Tottey S, Corselli M, Jeffries EM, Londono R, Peault B, Badylak SF. *Extracellular matrix degradation products and low-oxygen conditions enhance the regenerative potential of perivascular stem cells*. Tissue Engineering (Part A), 17: 37-44. 2011.

Turner NJ, Badylak SF. *Regeneration of skeletal muscle*. Cell Tissue Res, 347:759-774. 2012

Umnova MM, Seene TP. *The effect of increased functional load on the activation of satellite cells in the skeletal muscle of adult rats*. In J Sports Med, 12: 501-504. 1991.

Usas A, Huard J. *Muscle derived stem-cells for tissue engineering and regenerative therapy*. Biomaterials, 28: 5401-5406. 2007.

Valmier J, Tafti M, Baldy-Moulinier M. *Skeletal muscle extracts promote the survival of neurofilament-positive mammalian sensory neurons*. Neurosci Lett. 114: 39-44. 1990.

van der Meer SF, Jaspers RT, Jones DA, Degens H. *Time-course of changes in the myonuclear domain during denervation in young-adult and old rat gastrocnemius muscle*. Muscle Nerve. 43: 212-22. 2011.

van der Ven PF, Jap PH, Barth PG, Sengers RC, Ramaekers FC, Stadhouders AM. *Abnormal expression of intermediate filament proteins in X-linked myotubular myopathy is not reproduced in vitro*. Neuromusc Disord 5: 267-275. 1995.

van Haelst U. *An electron microscopic study of muscle in Werdnig-Hoffmann's disease*. Virchows Arch Abt A Path Anat, 351: 291-305. 1970.

Velleman SG. *Extracellular matrix and muscle development*. Basic Appl Myol, 8: 94-173. 1998.

Verdijk LB. *Satellite cell activation as a critical step in skeletal muscle plasticity*. Exp Physiol 99.11: 1449–1450. 2014

Verney J, Kadi F, Charifi N, Fèasson L, Ali Saafi M, Castells J, Piehl-Aulin K, Denis C. *Effects of combined lower body endurance and upper body resistance training on the satellite pool in elderly subjects*. Muscle Nerve, 38: 1147-1154. 2008.

Vitello L, Radu C, Malerba A, Segat D, Cantini M, Carraro U, Baroni MD. *Enhancing myoblast proliferation by using myogenic factors: a promising approach for improving fiber regeneration in sport medicine and skeletal muscle disease*. Basic Appl Myol, 14: 45-51. 2004.

Viguie CA, Lu DX, Huang SK, Rengen H, Carlson BM. *Quantitative study of the effects of long-term denervation on extensor digitorum longus muscle of the rat*. Anat Rec, 248(3): 346-354. 1997

Voytik SL, Przyborski M, Badylak SF, Konieczny SF. *Differential expression of muscle regulatory factor genes in normal and denervated adult rat hindlimb muscles*. Dev Dyn, 198: 214-224. 1993.

Wagers AJ, Conboy IM. *Cellular and molecular signatures review of muscle regeneration: current concepts and controversies in adult myogenesis*. Cell, 122: 659–667. 2005.

Wakayama Y. *Electron microscopic study on the satellite cell in the muscle of Duchenne muscular dystrophy*. J Neuropathol Exp Neurol, 35: 532-540. 1976.

- Walters EH, Stickland NC, Loughna PT. *The expression of the myogenic regulatory factors in denervated and normal muscles of different phenotypes*. J Muscle Res Cell Motil, 21: 647-653. 2000.
- Wang LC, Kernell D. *Fibre type regionalisation in lower hindlimb muscles of rabbit, rat and mouse: a comparative study*. J Anat, 199: 631– 643. 2001
- Wang YX, Rudnicki MA. *Satellite cells, the engines of muscle repair*. Nat Rev Mol Cell Biol, 13: 127-33. 2011.
- Warhol M.J., Siegel M.J., Evans W.J. Silverman L.M. *Skeletal muscle injury and repair in marathon runners after competition*. Am J Pathol. 118. 331-339. 1985.
- Watkins SC, Cullen MJ. *A quantitative study of myonuclear and satellite cell nuclear size in Duchenne's muscular dystrophy, polymyositis and normal human skeletal muscle*. Anat Rec, 222: 6-11. 1988.
- Watt DJ, Morgan JE, Clifford MA, Partridge TA. *The movement of muscle precursor cells between adjacent regenerating muscles in the mouse*. Anat Embryol (Berl.) 175: 527-536. 1987.
- Watt DJ, Karasinski J, Moss J, England MA. *Migration of muscle cells*. Nature, 368: 406–407. 1994
- Weber FL Jr, Macechko PT, Kelson SR, Karajiannis E, Hassan MO. *Increased muscle protein catabolism caused by carbon tetrachloride hepatic injury in rats*. Gastroenterology 102, 1700-1706. 1992.
- Wernig A, Bone M, Irintchev A, Schäfer R., Cullen MJ. *M-cadherin is a reliable marker of quiescent satellite cells in mouse skeletal muscle*. Basic Appl Myol, 14: 161-168. 2004
- White TP, Esser KA. *Satellite cell and growth factor involvement in skeletal muscle growth*. Med Sci Sports Exerc, 21: 158-163. 1989.
- White JD, Grounds MD. *Harnessing the therapeutic potential of myogenic stem cells*. Cytotechnology, 41: 153-164. 2003.
- White RB, Biérinx AS, Gnocchi VF, Zammit PS. *Dynamics of muscle fibre growth during postnatal mouse development*. BMC Dev Biol. 10: e21. 2010.
- Winkel LPF, Kamphoven JHJ, van den Hout HJMP, Severijnen LA, van Doorn PA, Reuser AJJ, van der Ploeg ATA. *Morphological changes in muscle tissue of patients with infantile Pompe's disease receiving enzyme replacement therapy*. Muscle Nerve, 27: 743-751. 2003.
- Wokke JHJ, van den Oord CJM, Leppink GJ, Jennekens FGI. *Perysynaptic satellite cells in human external intercostal muscle: a quantitative and qualitative study*. Anat Rec, 223: 174-180. 1989.

- Wong S-P, Rowley JE, Redpath AN, Tilman JD, Fellous TG, Johnson JR. *Pericytes, mesenchymal stem cells and their contributions to tissue repair*. Pharmacol Ther, 151: 107-20. 2015.
- Wozniak AC, Kong J, Bock E, Pilipowicz O, Anderson JE. *Signaling satellite-cell activation in skeletal muscle: markers, models, stretch, and potential alternate pathways*. Muscle Nerve, 31: 283-3000. 2005.
- Wright VJ, Peeng H, Huard J. *Muscle-based gene therapy and tissue engineering for the musculoskeletal system*. Drug Discov Today, 6: 728-733. 2001.
- Xing H, Zhou M, Assinck P, Liu N. *Electrical stimulation influences satellite cell differentiation after sciatic nerve crush injury in rats*. Muscle Nerve. 51: 400-411. 2015
- Xu X, Wilschut KJ, Kouklis G, Tian H, Hesse R, Garland C, Sbitany H, Hansen S1, Seth R, Knott PD, Hoffman WY, Pomerantz JH. *Human satellite cell transplantation and regeneration from diverse skeletal muscles*. Stem Cell Reports, 5: 419-434. 2015.
- Yablonka-Reuveni Z, Rivera AJ. *Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers*. Dev Biol, 164:588–603.1994.
- Yablonka-Reuveni Z. *The skeletal muscle satellite cell: still young and fascinating at 50*. J Histochem Cytochem, 59: 1041-1059. 2011.
- Yajima H, Motohashi N, Ono Y, Sato S, Ikeda K, Masuda S, Yada E, Kanasaki H, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Kawakami K. *Six family genes control the proliferation and differentiation of muscle satellite cells*. Exp Cell Res, 316: 2932-2944. 2010.
- Yamada S, Buffinger N, Dimario J, Strohman RC. *Fibroblast growth factor is stored in fiber extracellular matrix and plays a role in regulating muscle hypertrophy*. Med Sci Sports Exerc, 21: S173-S180. 1989.
- Yin H, Price F, Rudnicki MA. *Satellite cells and the muscle stem cell niche*. Physiol Rev, 93: 23-67. 2013
- Yiou R, Lefaucher JP, Atala A. *The regeneration process of the striated urethral sphincter involves activation of intrinsic satellite cells*. Anat Embryol, 206: 429-435. 2003.
- Yoshimura K, Harii K. *A regenerative change during muscle adaptation to denervation in rats*. J Surg Res, 81: 139-146. 1999.
- Yun Y, McFarland DC, Pesall JE, Gilkerson KK, Vander Wal LS, Ferrin NH. *Variation in response to growth factor stimuli in satellite cell populations*. Comp Biochem Physiol, 117A: 463-470. 1997.

Zádor E, Mendler L, Takacs V, De Bleecker J, Wuytack F. *Regenerating soleus and extensor digitorum longus muscles of the rat show elevated levels of TNF- α and its receptors, TNFR-60 and TNFR-80.* Muscle Nerve, 24: 1058-1067. 2001.

Zammit PS. *All muscle satellite cells are equal, but are some more equal than others?* Journal of Cell Science, 121: 2975-2982. 2008

Zeng C, Pesall JE, Gilkerson KK, McFarland DC. *The effect of hepatocyte growth factor on turkey satellite cell proliferation and differentiation.* Poult Sci, 81:1191–1198. 2002

Zhang M, McLennan IS. *Use of antibodies to identify satellite cells with a light microscope.* Muscle Nerve, 17: 987-994. 1994

Zimowska M, Kasprzycka P, Bocian K, Delaney K, Jung P, Kuchcinska K, Kaczmarska K, Gladysz D, Streminska W, Ciemerych MA. *Inflammatory response during slow- and fast-twitch muscle regeneration.* Muscle Nerve, 55: 400-409. 2017

Criterios de calidad de los artículos publicados

Journal Citation Report® 2016

Los artículos derivados de la tesis han sido publicados en las siguientes revistas

E. Agüera, S. Castilla, E. Luque, I. Jimena, I. Ruz-Caracuel, F. Leiva-Cepa, J. Peña. *Muscular atrophy and hypertrophy in normal rats induced by administration of various muscle extracts* **Histology & Histopathology**, 31: 1367-1379. 2016

HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY

ISSN: 0213-3911

Categories: PATHOLOGY - SCIE

Puesto: 36/79 Cuartil: Q2

E. Agüera, S. Castilla, E. Luque, I. Jimena, F. Leiva-Cepas, I. Ruz-Caracuel, J. Peña. *Denervated muscle extract promotes recovery of muscle atrophy through activation of satellite cells. An experimental study* **Journal Sport and Health Sciences**, aceptado 28/3/2017

JOURNAL OF SPORT AND HEALTH SCIENCE

ISSN: 2095-2546

Categories: SPORT SCIENCES – SCIE

Puesto: 18/81 Cuartil: Q1

Otros artículos relacionados con la temática y metodología de la tesis y desarrollados durante la etapa doctoral:

E. Luque, I. Ruz-Caracuel, F.J. Medina, F. Leiva-Cepas, E. Agüera, F. Sánchez-López, R. Lillo, M. Aguilar-Luque, I. Jimena, I. Túnez, J. Peña. *Skeletal muscle findings in experimental autoimmune encephalomyelitis*. **Pathology Research and Practice**, 211: 493-504. 2015

PATHOLOGY RESEARCH & PRACTICE

ISSN: 0213-3911

Categories: PATHOLOGY - SCIE

Puesto: 53/79 Cuartil: Q3

E. Agüera, E. Luque, R. López-Martos, I. Jimena, I. Túnez, J. Peña. *Myotoxic effects of 3-nitropropionic acid on rat.*

En revisión por la revista:

EXPERIMENTAL AND TOXICOLOGIC PATHOLOGY

ISSN: 0940-2993

Categories: PATHOLOGY - SCIE

Puesto: 45/79 Cuartil: Q2

Muscular hypertrophy and atrophy in normal rats provoked by the administration of normal and denervated muscle extracts

Eduardo Agüera^{1,4*}, Salvador Castilla^{2*}, Evelio Luque^{3,4}, Ignacio Jimena^{3,4,5},
Fernando Leiva-Cepas^{3,4,5}, Ignacio Ruz-Caracuel^{3,4#} and José Peña^{3,4,5}

¹Department of Neurology, Reina Sofia University Hospital, ²Department of Critical Care and Emergency, Reina Sofia University Hospital, ³Department of Morphological Sciences, Section of Histology, Faculty of Medicine and Nursing, University of Cordoba, ⁴Maimonides Institute for Biomedical Research IMIBIC, Reina Sofia University Hospital, University of Cordoba and ⁵Research Group in Muscle Regeneration, University of Cordoba, Cordoba, Spain

* Both authors contributed equally to this work

Present address: Department of Pathology, La Paz University Hospital, Madrid, Spain

Summary. This study was conducted to determine the effects of extracts obtained from both normal and denervated muscles on different muscle types. Wistar rats were used and were divided into a control group and four experimental groups. Each experimental group was treated intraperitoneally during 10 consecutive days with a different extract. These extracts were obtained from normal soleus muscle, denervated soleus, normal *extensor digitorum longus*, and denervated *extensor digitorum longus*. Following treatment, the soleus and *extensor digitorum longus* muscles were obtained for study under optic and transmission electron microscope; morphometric parameters and myogenic responses were also analyzed. The results demonstrated that the treatment with normal soleus muscle and denervated soleus muscle extracts provoked hypertrophy and increased myogenic activity. In contrast, treatment with extracts from the normal and denervated EDL had a different effect depending on the muscle analyzed. In the soleus muscle it provoked hypertrophy of type I fibers and increased myogenic activity, while in the *extensor digitorum longus* atrophy of the type II fibers was observed without changes in myogenic activity. This suggests that the muscular responses of atrophy and hypertrophy may depend on different factors related to the muscle type which could be related to innervation.

Key words: Skeletal muscle, Hypertrophy, Atrophy, Satellite cell, Denervated muscle extract

Introduction

Skeletal muscle properties and maturation are modulated by both neural and non-neural factors, such as action potentials, contractile activity, and the mediation of known and unknown neurotrophic substances (Hyatt et al., 2003, 2006). Changes occur following denervation, either as a result of altered metabolic demands or related to the establishment of optimal conditions for the reinnervation of muscular fibers (Magnusson et al., 2005). Therefore, a muscle with loss of motor innervation may, at least in the early stages, be a rich source of signals that can affect both muscle fibers and satellite cells. In fact, following adult skeletal muscle denervation myogenesis is reactivated (Borisov et al., 2001) affecting satellite cell activity (Bornemann et al., 1999; Yoshimura and Harii, 1999), possibly via factors released by the muscle fibers that diffuse through the tissue (Schmalbruch and Lewis, 2000; Ehrhardt and Morgan, 2005). Therefore, extracts obtained from denervated soleus muscle have a myotrophic effect *in vivo* on the soleus muscle of normal rats manifest by muscular fiber hypertrophy and formation of new muscle fibers (Jimena et al., 1993, 1998; Pena et al., 1995). Furthermore, it has been found that skeletal muscle extracts contain neurotrophic factors that promote the survival of motoneurons *in vitro*

(Valmier et al., 1990; Comella et al., 1994).

Nevertheless, the disruption of nerve motor and trophic control also appears to provoke different responses depending on the muscle type. For example, it is known that denervation atrophy is more pronounced in fast-twitch muscle than in slow-twitch muscle (Dedkov et al., 2003) and while muscles composed exclusively of white fibers atrophy, red muscles initially hypertrophy (Bakou et al., 2014). Furthermore, although the reason is unknown, it appears that the neural influence on the differentiation of satellite cells is greater in red muscle than in white muscle (Hyatt et al., 2006). Based on these differences between red and white muscle, and specifically their reaction to loss of innervation, we postulated that the effects of muscle extracts obtained from red or white muscles as well as their responses could differ.

In the present study, we analyze whether extracts obtained from both normal and denervated soleus muscle (typically red muscle with 85-100% slow-twitch fibers) and normal and denervated extensor digitorum longus (EDL) (typically white muscle with around 95% fast-twitch fibers) have similar effects on the soleus and EDL muscles in normal rats. Surprisingly, while the extracts obtained from the soleus muscle provoked hypertrophy in both muscles, the extracts from the EDL induced atrophy in EDL muscles but not in soleus muscles.

Materials and methods

Animals and research design

In this study a total of 80 Wistar rats (250-300 g body weight) were used. The rats were housed in a temperature controlled cage (24°C), maintained in a light-dark cycle of 12-12 hours and had *ad libitum* access to water and food. All procedures described in this study regarding animal care and experimentation were approved by the Bioethics Committee of the University of Cordoba.

Twenty rats were divided in five groups: four experimental groups and one control. Each experimental group (n=4) was treated with a different type of muscle extract obtained from normal soleus muscle (n-SOL-ex), denervated soleus muscle (d-SOL-ex), normal EDL (n-EDL-ex), or denervated EDL (d-EDL-ex). Normal rats (n=4) without any type of intervention were used as a control group.

Muscle extracts and treatment of rats

Sixty rats were used to obtain muscle extracts. To obtain extracts from denervated muscle, the rats underwent a complete bilateral transection of the sciatic nerves (from which a 10 mm long segment was extracted). The soleus and EDL muscles were excised 4

days post-denervation, as previous studies have found that extracts obtained during this time period had a greater effect (Jimena et al., 1998). The rats in each experimental group were injected intraperitoneally (1 ml/day during 10 consecutive days) with the corresponding type of extract. The method used to obtain the extracts has been previously described (Jimena et al., 1993). Briefly, the muscles were minced, homogenized in PBS (4°C), centrifuged at 4,000 rpm (5 min) and filtered successively through 5 μ m and 3 μ m Millipore filters; the resulting material was centrifuged at 8,000 rpm (3 min) and the supernatant successively filtered through 0.8 μ m, 0.45 μ m and 0.22 μ m Millipore filters.

The rats were sacrificed at the end of the experimental protocol; each rat was first anaesthetized with an intraperitoneal injection of 75 mg/kg of Ketamine (Imalgene® 100 mg/ml, Merial Laboratories, Lyon, France) and killed by decapitation. The soleus and EDL muscles of both posterior limbs were excised and the muscle belly obtained. These were sectioned, mounted transversely on cork disks and frozen in isopentane cooled by liquid nitrogen. A series of transverse sections 8 μ m thick were obtained in a cryostat (Leica CM1850 UV).

The sections were stained following standardized procedures (Dubowitz and Sewry, 2007) with hematoxylin-eosin (H-E), modified Gomori trichrome for general morphological analysis, and acridine orange (AO) in order to identify abundant RNA in the muscle fibers. To identify fiber types, nicotinamide adenine dinucleotide tetrazolium reductase (NADH-TR) and adenosine triphosphatase (ATPase, pH 9.6) histochemical methods were used. Immunostaining for desmin was performed using a monoclonal antibody (1:50, Desmin, DE-R-11, Dako, Denmark), incubated for 2 hours and visualized with the LSAB+System-HRP (K0979, Dako, Denmark) following the manufacturer's instructions. The expression of Desmin in cells associated with muscle fibers was used as a marker of satellite cell activation and to detect early activated myogenic precursor cells *in vivo* (Lawson-Smith and McGeachie, 1998).

Transmission electron microscopy

Small fragments were excised from each muscle and were fixed by 24 hours immersion in 2.5% glutaraldehyde in phosphate buffer at pH 7.4. Next, the fragments were washed in buffer and postfixed with 1% OsO₄. Following dehydration with acetones, the fragments were embedded in araldite. Ultrathin sections were obtained with an LKB 8800 Ultratome III microtome, collected on copper grids and stained with uranyl acetate and lead citrate. Sections were examined using a Philips CM10 Transmission electron microscope installed at the Central Research Support Service (SCAI, University of Córdoba, Spain).

Morphometric analysis

In each muscle, five fields (0.2 mm² each) were photographed at random at x200 magnification in order to measure parameters of muscle fiber size (fiber cross-sectional area and lesser diameter) and number of fibers/area. Myofibrillar ATPase pH 9.6 staining was used to measure the size of type I and II fibers in the soleus muscle and NADH-tr stain was used to measure the size of the type I, IIa and IIb fibers in the EDL. Sections were photographed using a Sony Exwaved HAD digital camera mounted on a Nikon Eclipse E1000 microscope (Nikon, Tokyo, Japan). Morphometric analysis was performed using the image analysis program Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Bethesda, MA, USA).

To evaluate myogenic response, in sections stained with antidesmin the following was recorded: number of desmin+ activated satellite cells, mononuclear desmin+ cells, and desmin+ small muscle fibers. Two independent investigators blind to the sample identification performed all measurements and quantifications. At least 300 fibers per muscle were evaluated (2,400 fibers/group).

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard deviation (S.D.) of the mean for the 40 areas analyzed encompassing the two muscles of all the animals in each group. ANOVA analysis of variance was performed followed by the Holm-Sidak test if data passed the normality test, or the Dunn test for non-normal data.

Results

Control group

The organization and structure of the muscle fibers

were completely normal in both soleus and EDL muscles in the normal rats, noting the considerable homogeneity in the size of the fibers in the soleus muscle, whereas in the EDL there were differences in size between fiber types (Fig. 1). In all cases the muscle fibers demonstrated polygonal profiles with peripheral nuclei. Ultrastructurally, the muscle fibers did not show any type of change and sporadic unactivated satellite cells were found.

Experimental groups

Effects of extract derived from the soleus muscle

The extracts obtained from both the normal and denervated soleus muscles provoked a myotrophic effect in both the soleus and EDL muscles. As shown by the increase in cross-sectional area, lesser diameter and the decrease in the number of fibers per area, both muscles responded with hypertrophy of muscle fibers and there were significant differences for these parameters relative to the control (Tables 1, 2). Additionally, a myogenic response consisting of muscle fiber neoformation and activation with differentiation in both satellite cells and cells located in the interstitial space was found with the antidesmin stain and quantitatively confirmed (Tables 3, 4). However, this response was generally greater when extract from denervated soleus was used compared with extract from normal muscle, and the response was always greater in the soleus muscle compared with the EDL.

The histological changes were common to both types of muscle, but were always more pronounced in the soleus muscle. With H-E the muscle fibers appeared to have a normal appearance with the exception of a higher number of nuclei. In some cases, a few were observed to be surrounded by a basophilic cytoplasmic halo protruding over the muscle fiber, which was very suggestive of activated satellite cells (Fig. 2). Between

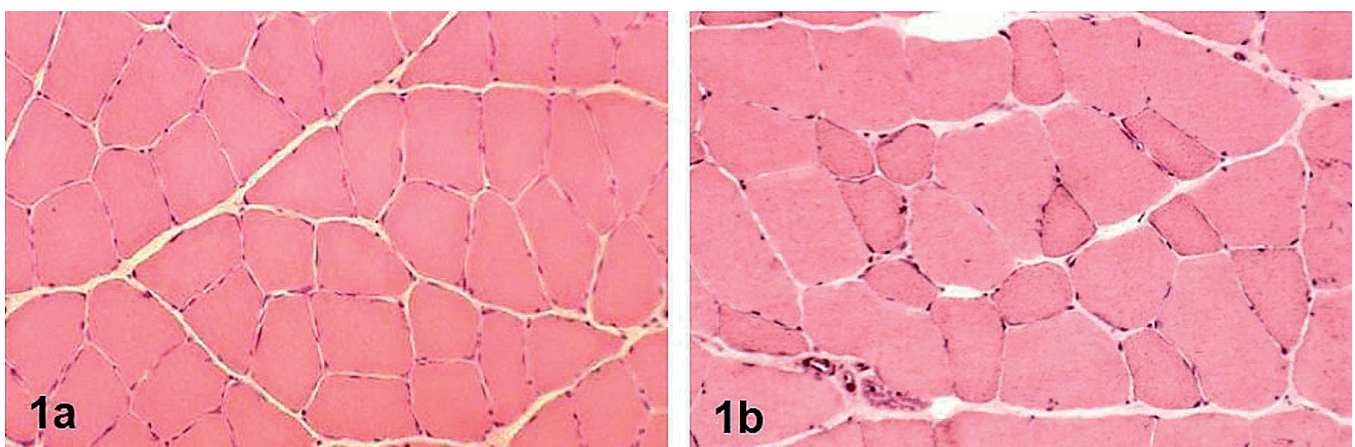


Fig. 1. Control group. Normal histology of soleus (a) and EDL (b) muscles. H&E. x 20

Muscle extracts and atrophy or hypertrophy of skeletal muscle

Table 1. Effects of extracts derived from soleus muscles: histomorphometric changes in soleus muscles.

	csfa type I (μm^2)	csfa type II (μm^2)	md type I (μm)	md type II (μm)	fibers/area
Control SOL	2744.60±606.73	2498.43±259.34	45.17±6.25	41.73±2.73	63.70±6.68
n-SOL-ex	3617.73±1059.49 ^a	3176.17±572.48 ^a	50.33±9.10 ^a	50.92±6.52 ^a	50.40±7.01 ^a
d-SOL-ex	4024.52±983.62 ^{a,b}	3681.21±589.86 ^{a,b}	53.06±6.45 ^{a,b}	53.38±6.25 ^a	44.82±3.81 ^{a,b}

csfa, cross-sectional fiber area; md, minor diameter; fibers/area, number of fibers/area. Values are mean ± SD. ^a: significant differences vs control ($P<0.05$); ^b: significant differences vs n-SOL-ex ($P<0.05$).

Table 2. Effects of extracts derived from soleus muscles: histomorphometric changes in EDL muscles.

	csfa type I (μm^2)	csfa type IIa (μm^2)	csfa type IIb (μm^2)	md type I (μm)	md type IIa (μm)	md tipo IIb (μm)	fibers/area
Control EDL	1100.56±185.77	1973.51±330.58	3425.97±484.57	28.41±3.77	38.52±6.15	52.99±5.47	69.20±5.76
n-SOL-ex	1469.03±242.08 ^a	2499.94±385.62 ^a	4107.26±758.72 ^a	33.86±4.42 ^a	44.26±4.26 ^a	58.26±8.07 ^a	60.04±3.00 ^a
d-SOL-ex	1396.22±230.90 ^a	2321.07±288.12 ^a	3771.51±316.74 ^{a,b}	31.72±4.17 ^a	43.19±2.59 ^a	55.51±4.69 ^{a,b}	61.00±2.34 ^a

csfa, cross-sectional fiber area; md, minor diameter; fibers/area, number of fibers/area. Values are mean ± SD. ^a: significant differences vs control ($P<0.05$); ^b: significant differences vs n-SOL-ex ($P<0.05$).

Table 3. Effects of extracts derived from soleus muscles: myogenic response in soleus muscles.

	Nuclei/fiber	Desmin+ SC	Desmin+ IC	Desmin+ SF
Control SOL	1.54±0.14	0.16±0.06	0.16±0.10	0.23±0.09
n-SOL-ex	2.88±0.27 ^a	3.29±0.40 ^a	1.12±0.30 ^a	0.91±0.15 ^a
d-SOL-ex	2.99±0.20 ^a	3.56±0.37 ^a	1.90±0.45 ^{a,b}	1.20±0.26 ^a

Nuclei/fiber, number of nuclei / fiber; Desmin+ SC, positive satellite cells for desmin; Desmin+ IC, positive interstitial cells for desmin; Desmin+ SF, positive small fibers for desmin. Values are mean ± SD. ^a: significant differences vs control ($P<0.05$); ^b: significant differences vs n-SOL-ex ($P<0.05$).

Table 4. Effects of extracts derived from soleus muscles: myogenic response in EDL muscles.

	Nuclei/fiber	Desmin + SC	Desmin+ IC	Desmin+ SF
Control EDL	1.58±0.14	0.20±0.07	0.13±0.07	0.10±0.05
n-SOL-ex	2.11±0.15 ^a	0.72±0.11 ^a	0.32±0.10 ^a	0.59±0.09 ^a
d-SOL-ex	2.38±0.29 ^a	0.82±0.17 ^a	0.35±0.11 ^a	0.42±0.18 ^a

Nuclei/fiber, number of nuclei / fiber; Desmin+ SC, positive satellite cells for desmin; Desmin+ IC, positive interstitial cells for desmin; Desmin+ SF, positive small fibers for desmin. Values are mean ± SD. ^a: significant differences vs control ($P<0.05$); ^b: significant differences vs n-SOL-ex ($P<0.05$).

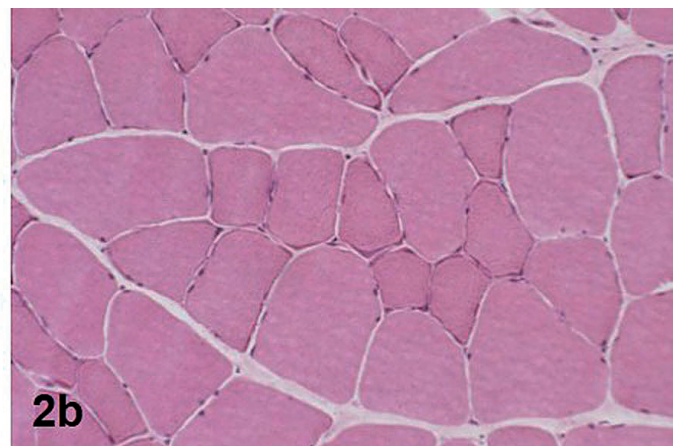
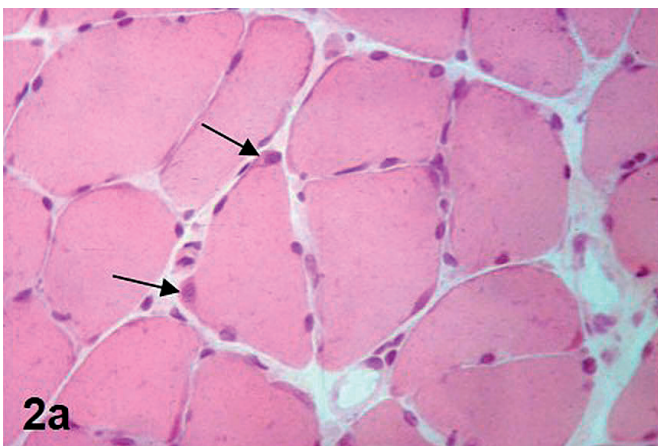


Fig. 2. d-SOL-ex group. **a.** Soleus muscle. Muscle fibers are large with an apparent increase in the number of nuclei; some of them are very large, have a rounded morphology and are surrounded by a basophilic ring (arrows). **b.** EDL muscle. Muscle fibers are increased in size with no apparent changes in the nuclei. H&E. x 40

Muscle extracts and atrophy or hypertrophy of skeletal muscle

the muscle fibers, small basophilic fibers were observed occupying the edges of the muscle bundles. With AO stain, the periphery of the muscle fibers was outlined with intense orange fluorescence and a higher number of nuclei were also evident (Fig. 3); the small fibers also showed an intense orange fluorescence. No

cytoarchitectural changes were observed with histochemical stains, even in the percentage of fiber types (Figs. 4, 5).

The immunohistochemical stain with desmin revealed the presence of desmin+ peripheral profiles suggestive of activated satellite cells, desmin+

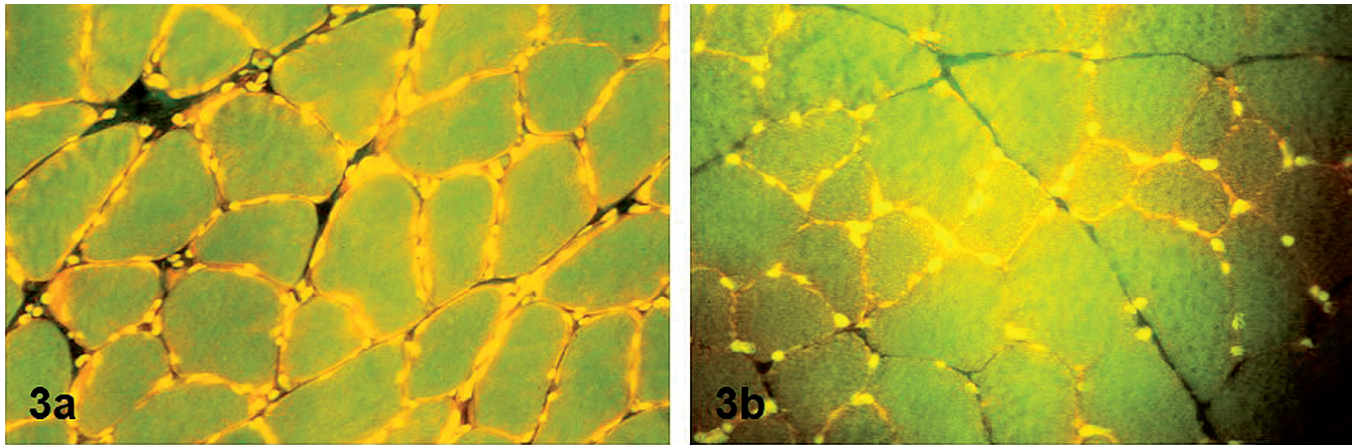


Fig. 3. d-SOL-ex group. **a.** Soleus muscle. Muscle fibers exhibit orange fluorescence at the periphery with an obvious greater number of nuclei (yellow fluorescence). **b.** EDL muscle. Note that the increase in the orange fluorescence and in the number of nuclei is smaller compared with the soleus muscle. Acridine orange. x 40

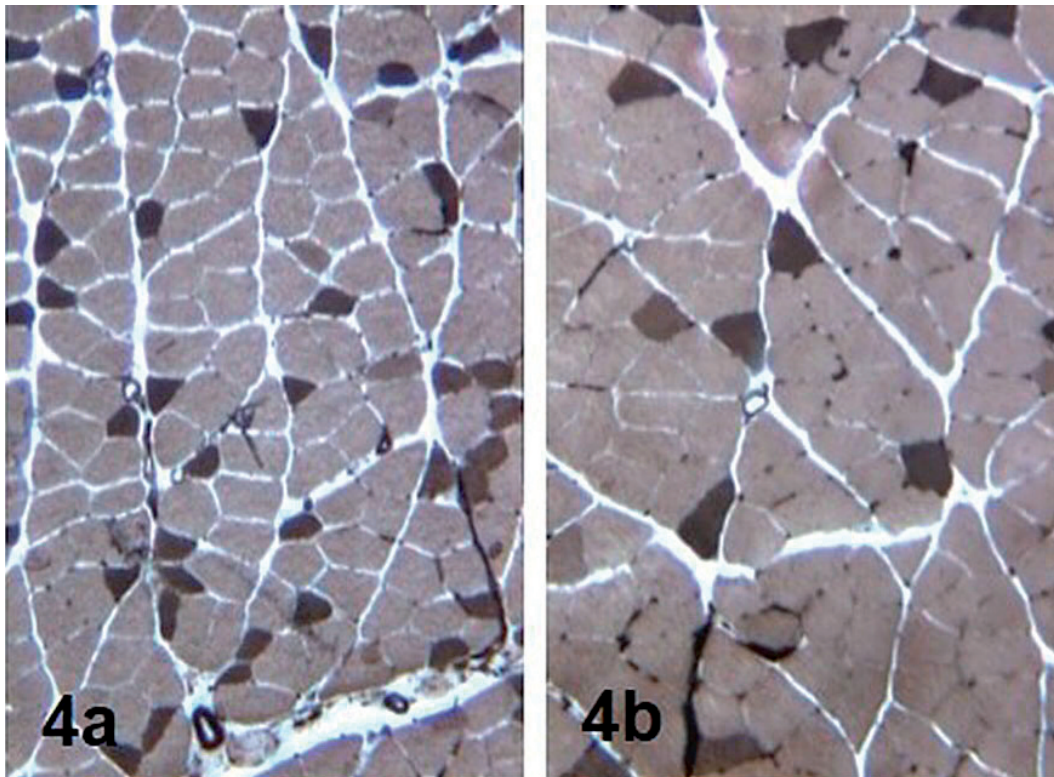


Fig. 4. **a.** Control group. Soleus muscle. Cross section stained with myosin ATPase at pH 9.6 showing the type I (light) and type II fibers (dark). **b.** d-SOL-ex group. Soleus muscle. Note that compared with the previous image, the muscle fibers are larger in size and apparently there is no change in fiber type. x 10

mononuclear cells isolated or grouped in the interstitial space, and also desmin+ small muscle fibers (Fig. 6). The latter demonstrated basophilia with H-E and fluorescent orange with AO staining.

Analysis with electron microscope confirmed the observations made with light microscopy. Many muscle fibers showed a subsarcolemmic space that was enlarged and occupied by numerous ribosomes. The myofibrillar organization was preserved with the exception of some

small areas of myofibrillar disruption. Activated satellite cells were also found, correlating well with that observed with light microscopy; protruding over the muscle fiber surface and demonstrating increased cytoplasm with mitochondria and abundant ribosomes (Fig. 7). There was no morphological evidence that these cells crossed the basal lamina

In the vicinity of the muscle fibers, mononucleated cells similar to satellite cells were found, although they

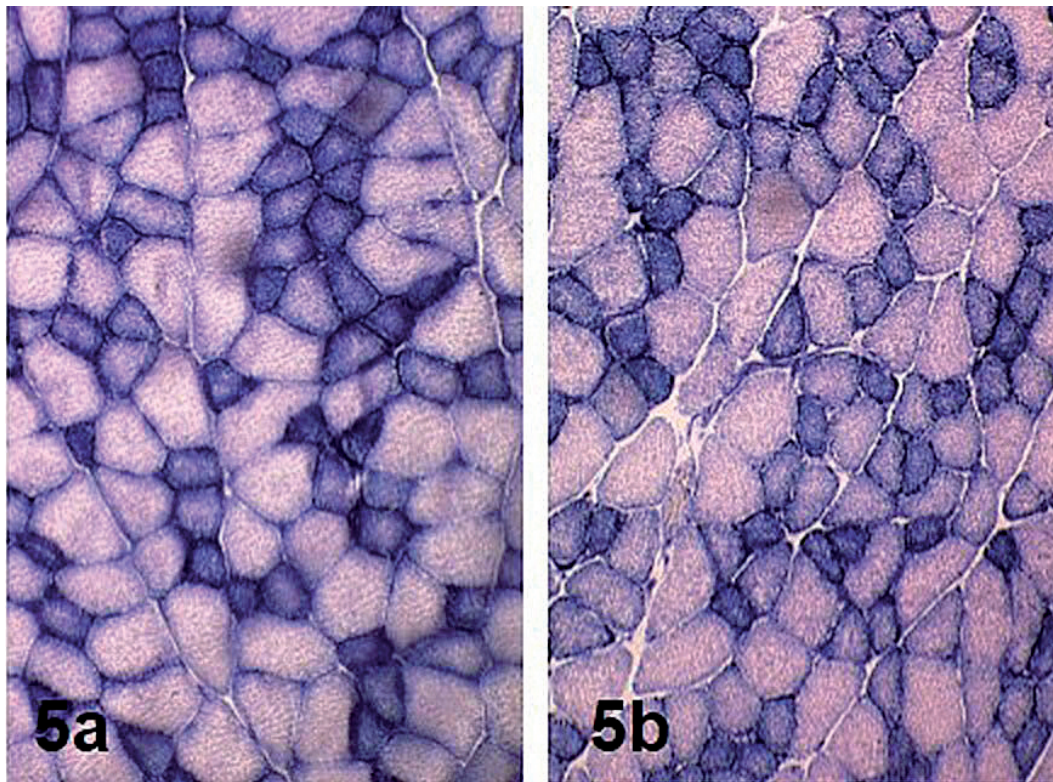


Fig. 5. a. Control group. EDL muscle. Different muscle fibre types can be identified by histochemical staining for NADH-tr type I (high oxidative) appear dark, type IIb fibers (low oxidative) appear light and type IIa appear intermediate. **b.** d-SOL-ex group. EDL muscle. Apparently the size and proportion of fiber types are very similar to the previous image. x 10

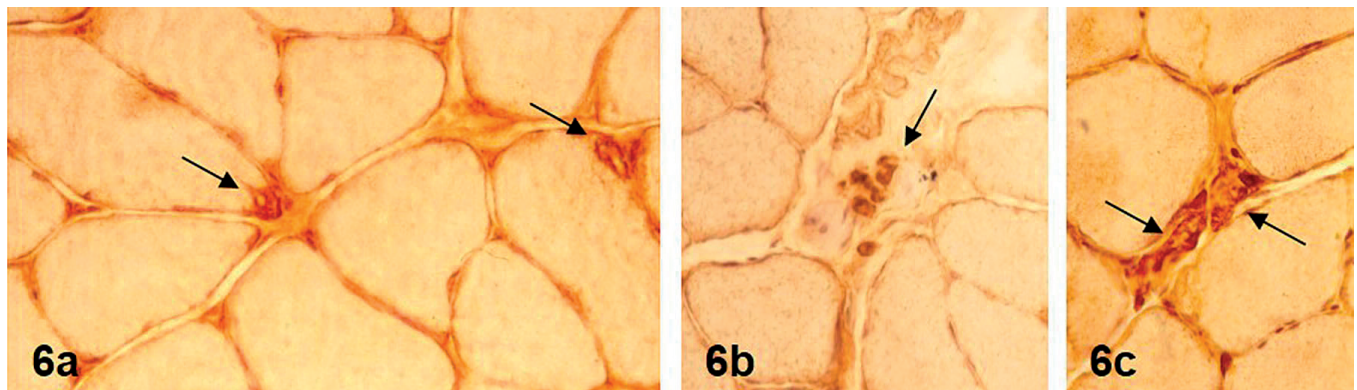


Fig. 6. d-SOL-ex group. Soleus muscle. Arrows indicate: peripheral increase of immunolabelling with desmin antibody, probably corresponding to activated satellite cells (**a**), a group of several desmin + cells located in the perimysial space (**b**) and two desmin + small muscle fibers (**c**). x 40

Muscle extracts and atrophy or hypertrophy of skeletal muscle

were completely surrounded by a basal lamina (Fig. 8); some of them had a more developed cytoplasm containing organelles (Fig. 8b). It was remarkable that many pericytes showed a developed cytoplasm, and

were separated considerably from the capillary wall (Fig. 9). We also found, alongside capillaries, small muscle fibers with ultrastructural features of neoformation: euchromatic nucleus, ribosomes, mitochondria and

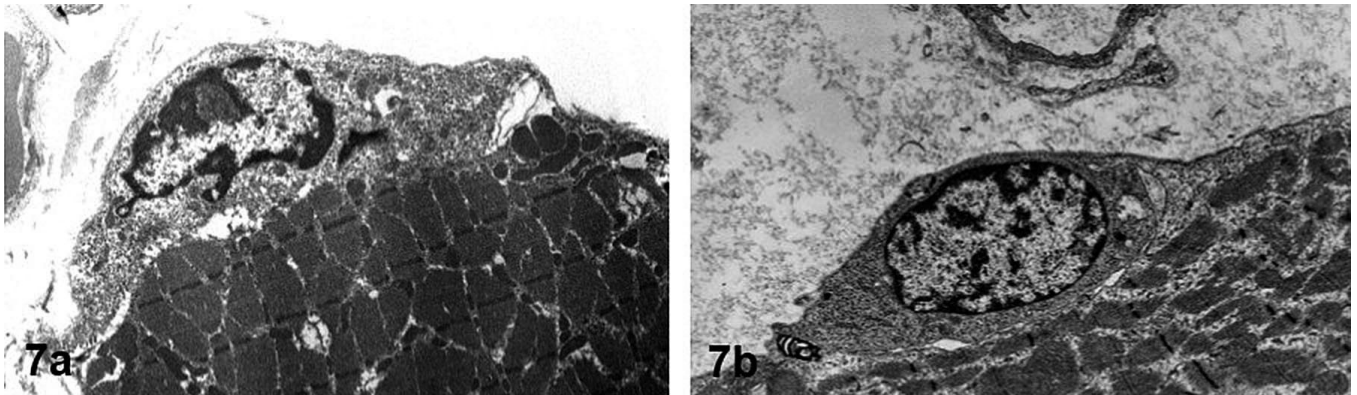


Fig. 7. d-SOL-ex group. **a.** Soleus muscle. A satellite cell activated with a large cytoplasm makes a protrusion at the surface of a muscle fiber. **b.** EDL muscle. Mildly activated satellite cell. **a.** x 5,200; **b.** x 3,900

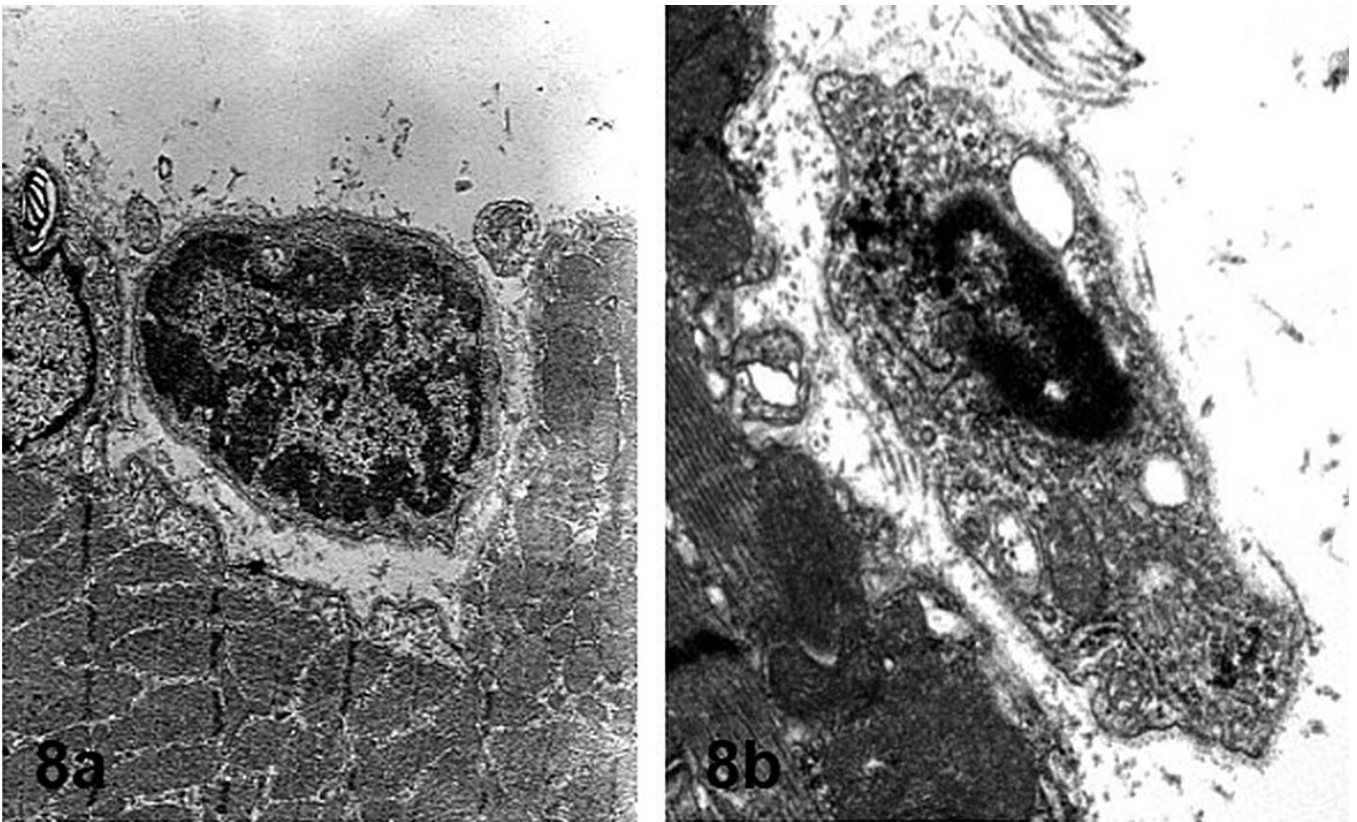


Fig. 8. d-SOL-ex group. **a.** Soleus muscle. Mononuclear cell with very little cytoplasm and completely surrounded by basal lamina. **b.** EDL muscle. Mononuclear cells with abundant cytoplasm containing ribosomes, mitochondria and rough endoplasmic reticulum; it is surrounded by a basal lamina. x 6,610



Fig. 9. d-SOL-ex group. Soleus muscle. Mononuclear cells surrounded by basal lamina next to a capillary, suggesting that it is a pericyte. Note that it contains a highly developed cytoplasm with mitochondria, ribosomes and rough endoplasmic reticulum. x 6,610

incipient myofibrils (Fig. 10).

Effects of extract derived from the EDL muscle

When EDL muscle extracts were utilized, the soleus and the EDL muscles responded differently. The soleus muscle, when treated with normal EDL extract, underwent hypertrophy of the type I fibers and showed a myogenic response (Tables 5, 7). However, treatment with denervated EDL extract resulted in atrophy of type II fibers and there was no myogenic response (Tables 5, 7).

The EDL muscle, when treated with normal EDL extract, suffered atrophy of the type IIa and IIb fibers and no myogenic response was observed. Treatment with denervated EDL extract resulted in atrophy of all fiber types and again no myogenic response was observed (Tables 6, 8).

The decrease in size appeared to affect the fibers as a whole, as no zones of varying size were found, the fibers exhibited a round profile, and no angulated atrophic fibers were seen. However, alteration of the staining pattern with NADH-tr was evident, with the presence of zones lacking enzymatic activity giving the fibers a *moth-eaten* aspect (Fig. 11). Ultrastructurally, in some fibers a distortion of the myofibrillar pattern (Fig. 12) and some pyknotic nuclei were observed.

Desmin immunostaining revealed no findings suggestive of myogenic response (Fig. 13). The satellite cells were observed to be inactive (Fig. 14) and no mononuclear cells surround by basal membrane, similar to those seen in the animal muscles treated with soleus and normal EDL extracts, were seen.

Table 5. Effects of extracts derived from EDL muscles: histomorphometric changes in soleus muscles.

	csfa type I (μm^2)	csfa type II (μm^2)	md type I (μm)	md type II (μm)	fibers/area
Control SOL	2744.60±606.73	2498.43±259.34	45.17±6.25	41.73±2.73	63.70±6.68
n-EDL-ex	3577.53±776.59 ^a	2833.66±538.75	50.28±8.71 ^a	44.00±6.42	49.26±3.99 ^a
d-EDL-ex	2856.06±1195.61 ^b	1766.66±375.67 ^{a,b}	45.70±10.95 ^b	35.55±5.73 ^{a,b}	61.56±4.38 ^b

csfa, cross-sectional fiber area; md, minor diameter; fibers/area, number of fibers/area. Values are mean ± SD. ^a: significant differences vs control ($P<0.05$); ^b: significant differences vs n-EDL-ex ($P<0.05$).

Table 6. Effects of extracts derived from EDL muscles: histomorphometric changes in EDL muscles.

	csfa tipo I (μm^2)	csfa tipo IIa (μm^2)	csfa tipo IIb (μm^2)	md tipo I (μm)	md tipo IIa (μm)	md tipo IIb (μm)	fibers/area
Control EDL	1100.56±185.77	1973.51±330.58	3425.97±484.57	28.41±3.77	38.52±6.15	52.99±5.47	69.20±5.76
n-EDL-ex	1031.59±211.96	1740.57±355.37 ^a	2526.59±367.55 ^a	28.49±4.09	35.02±3.51 ^a	45.86±4.34 ^a	93.40±3.05 ^a
d-EDL-ex	995.67±311.84 ^b	1701.48±232.08 ^{a,b}	2647.60±370.78 ^{a,b}	27.26±4.64 ^b	35.90±4.25 ^{a,b}	45.80±5.86 ^{a,b}	92.20±7.15 ^{a,b}

csfa, cross-sectional fiber area; md, minor diameter; fibers/area, number of fibers/area. Values are mean ± SD. ^a: significant differences vs control ($P<0.05$); ^b: significant differences vs n-EDL-ex ($P<0.05$).

Muscle extracts and atrophy or hypertrophy of skeletal muscle

Table 7. Effects of extracts derived from EDL muscles: myogenic response in soleus muscles.

	Nuclei/ fiber	Desmin+ SC	Desmin+ IC	Desmin+ SF
Control SOL	1.54±0.14	0.16±0.06	0.16±0.10	0.23±0.09
n-EDL-ex	2.02±0.38 ^a	3.27±0.51 ^a	1.24±0.40 ^a	0.78±0.21 ^a
d-EDL-ex	1.52±0.15 ^b	0.17±0.08 ^b	0.18±0.09 ^b	0.21±0.10 ^b

Nuclei/fiber, number of nuclei / fiber; Desmin+ SC, positive satellite cells for desmin; Desmin+ IC, positive interstitial cells for desmin; Desmin+ SF, positive small fibers for desmin. Values are mean ± SD. ^a: significant differences vs control (P<0.05); ^b: significant differences vs n-EDL-ex (P<0.05).

Table 8. Effects of extracts derived from EDL muscles: myogenic response in EDL muscles.

	Nuclei/ fiber	Desmin + SC	Desmin+ IC	Desmin+ SF
Control EDL	1.58±0.14	0.20±0.07	0.13±0.07	0.10±0.05
n-EDL-ex	1.53±0.16	0.24±0.09	0.11±0.06	0.12±0.04
d-EDL-ex	1.49±0.18 ^b	0.21±0.13 ^b	0.14±0.11 ^b	0.11±0.06 ^b

Nuclei/fiber, number of nuclei / fiber; Desmin+ SC, positive satellite cells for desmin; Desmin+ IC, positive interstitial cells for desmin; Desmin+ SF, positive small fibers for desmin. Values are mean ± SD. ^a: significant differences vs control (P<0.05); ^b: significant differences vs n-EDL-ex (P<0.05).

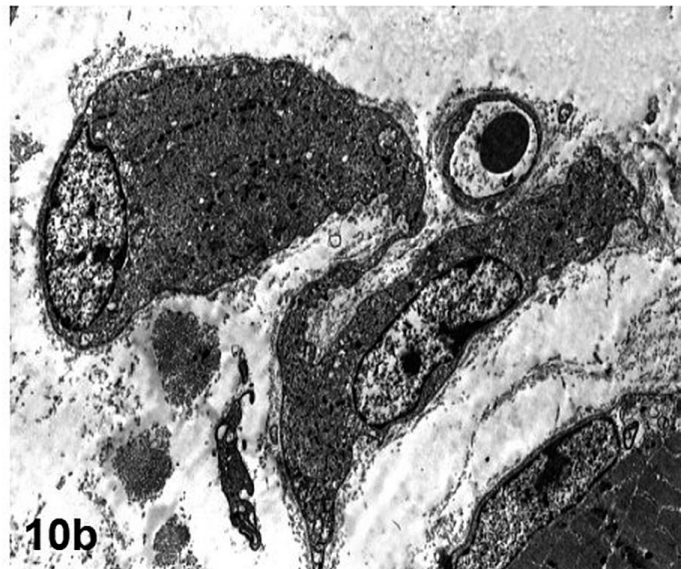
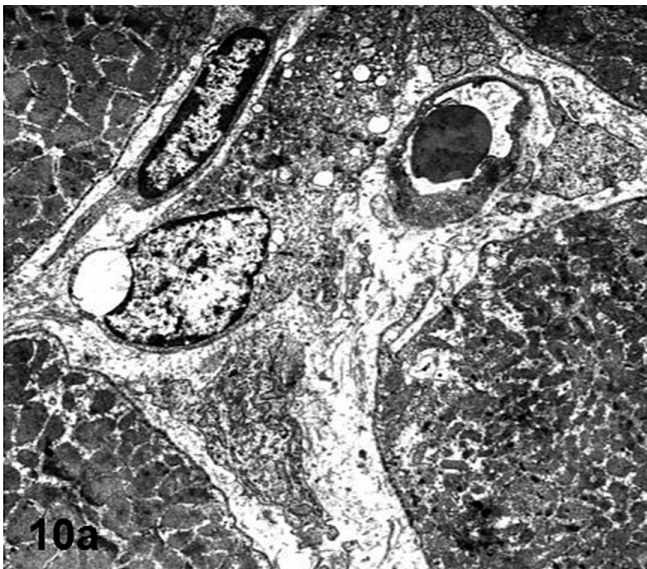


Fig. 10. d-SOL-ex group. Soleus muscle. **a, b.** Representative images of small muscle fibers located next to capillaries. These fibers contain incipient myofibrils and euchromatic nuclei. x 2,950

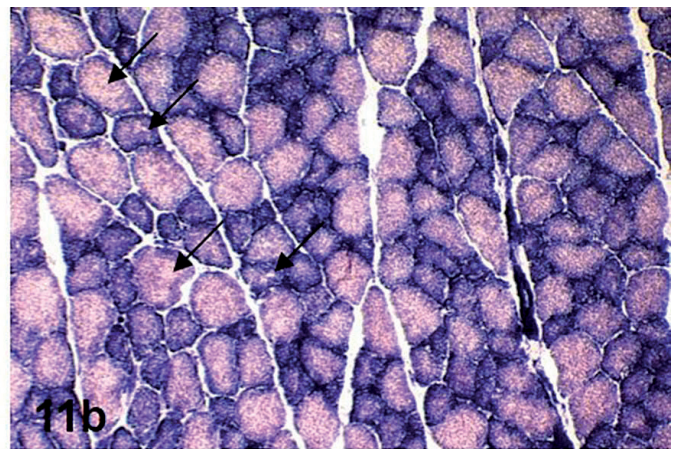
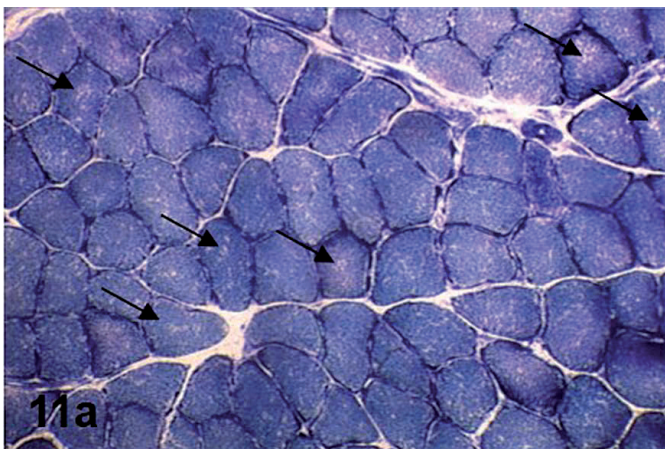


Fig. 11. d-EDL-ex group. **a.** Soleus muscle. Apparently normal muscle fibers, although some of them contain small areas with oxidative activity loss (arrows). **b.** EDL muscle. Compared with Figure 5a muscle fibers are smaller and some fibers show irregular absence of oxidative enzyme activity (arrows). NADH-tr. x 10

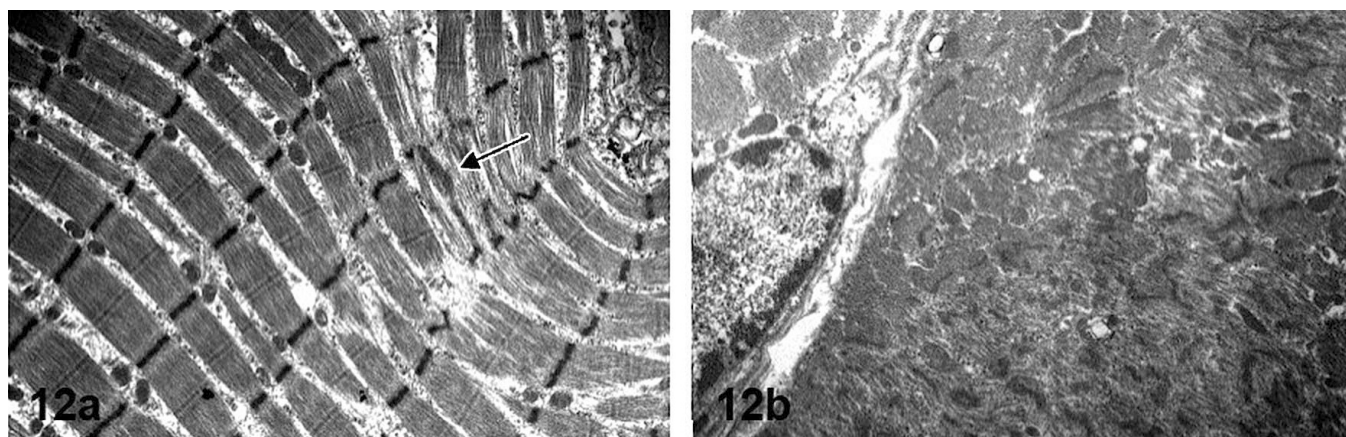


Fig. 12. d-EDL-ex group. **a.** Soleus muscle. Small area with myofibrils disruption (arrows). **b.** EDL muscle. Extensive Z disks streaming and disintegration of myofibrils. x 5,000

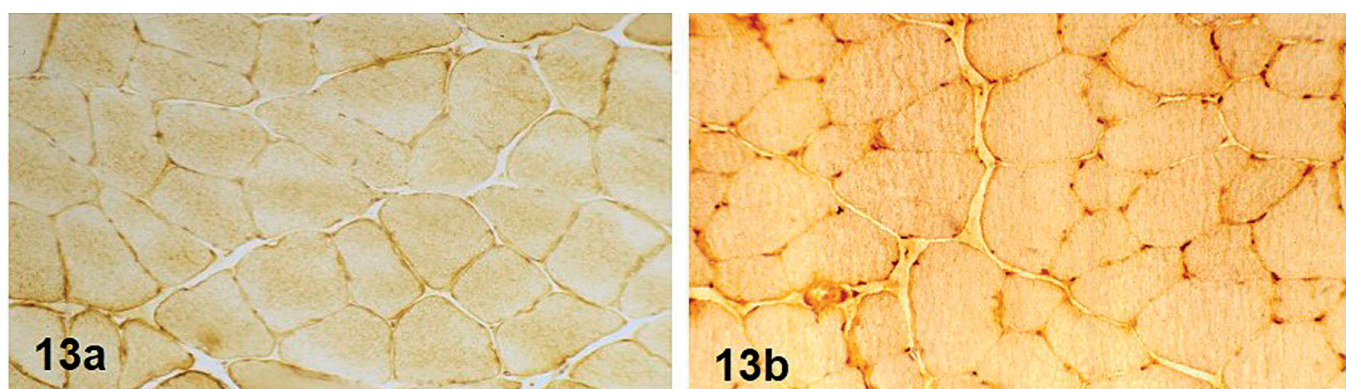


Fig. 13. d-EDL-ex group. Desmin immunostaining revealed no changes in soleus (**a**) or EDL muscle (**b**). x 40

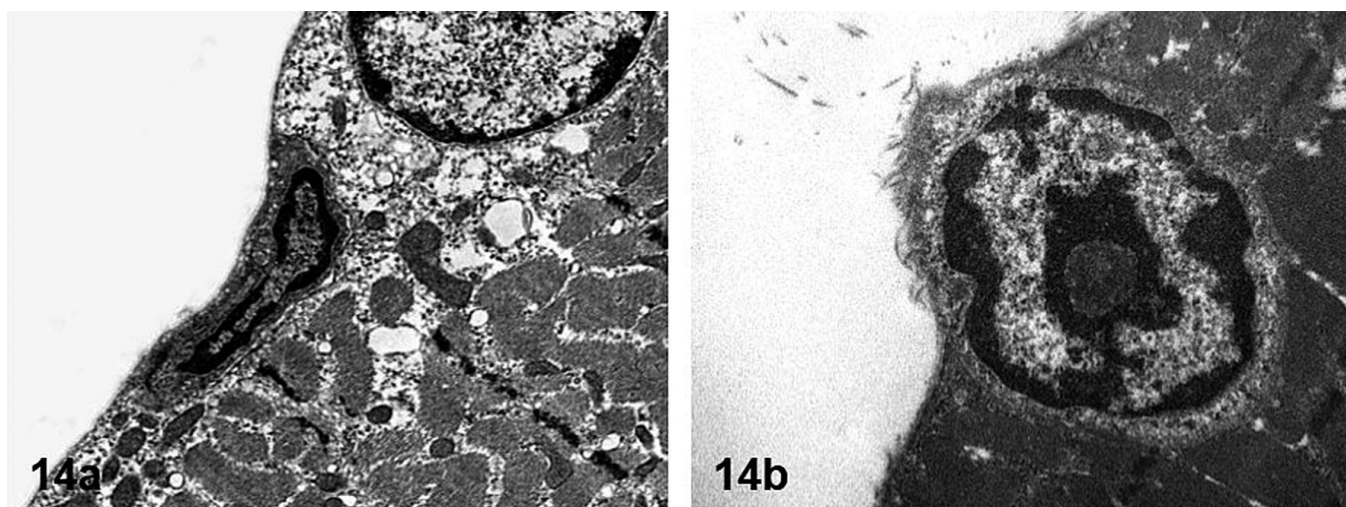


Fig. 14. d-EDL-ex group. Representative images of inactive satellite cells in soleus (**a**) and EDL muscles (**b**). **a.** x 5,200; **b.** x 6,610

Discussion

The heterogeneity of muscle fibers and the satellite cells of red and white muscles is well established (Gibson and Schultz, 1982; Armstrong and Phelps, 1984; Baranska et al., 1997; Lagord et al., 1998) as are the different responses to diverse physiologic and pathologic situations (Darr and Schultz 1987; Bassaglia and Gautron, 1995; Lagord et al., 1998; Carter et al., 2010; Luque et al., 2015). In our study we demonstrated that extracts obtained from denervated muscles induced *in vivo* a hypertrophic or atrophic response in normal skeletal muscle, depending on whether the extract was obtained from the soleus or EDL respectively. This suggests that after nerve section the different types of muscles modify their tissue microenvironment accumulating the substances contained in the extracts. These results are consistent with the existence of neural factors that, independent of electrical activity, play a role in the myogenic and skeletal muscle growth processes and that appear to differ between fast- and slow-twitch muscles (Hyatt et al., 2003, 2006).

Given the hypertrophic and greater myogenic responses in both the soleus and the EDL muscles when treated with extract obtained from the soleus, it is evident that the factors contained in this muscle are those responsible for this response. It is interesting to note that extracts from the *anterior latissimus dorsi* ALD (red muscle) but not the *pectoralis major* PM (white muscle) have a stimulatory effect on the myogenesis of embryonic myoblasts of both muscles in cell cultures (Matsuda et al., 1983). Our conclusion is further strengthened by the fact that the response to denervation differs between muscles. It has been shown that the *anterior latissimus dorsi* and the *posterior latissimus dorsi* PLD (white muscle) undergo different morphologic modifications when deprived of their innervation, whereas the PLD muscle progressively atrophies post denervation, and the ALD muscle hypertrophies (Bakou et al., 2014).

To our surprise, the EDL muscle, but not the soleus, responded with muscular atrophy when the rats were treated with EDL muscle extract. In this case, the differences must be related to the characteristics specific to the muscle type. This could explain the differences found in the responses of the soleus and EDL muscles to the extracts. It has been proposed that the myotrophic or atrophic effects of certain substances, such as growth factors, may depend on the metabolic characteristics of skeletal muscle (Martin et al., 1996). Our study reveals a greater susceptibility of type II fibers. Generally, atrophy processes affect white muscle more; for example, the atrophy of type II fibers is one of the most frequent changes observed in human muscle pathology in a large number of different diseases and disorders (Carpenter and Karpati, 2001). Similarly, white muscle undergoes greater atrophy than red muscle following denervation (Bobinac et al., 2000; Dedkov et al., 2003) or in response to starvation or hepatic disease (Weber et al.,

1992). It is striking that the motoneurons that innervate white muscles are preferentially affected in amyotrophic lateral sclerosis, whereas this does not occur in the soleus (Gordon et al., 2007).

Given that both the hypertrophic and atrophic effects of the extracts were greater when they were obtained from denervated muscle, it is clear that innervation must control the expression of the factors present in the extract. It is known that certain characteristics of muscle protein metabolism are under neural control, with differences between fast- and slow-twitch muscles (Guth and Watson, 1967), and that the denervation of a skeletal muscle leads to significant molecular and biochemical changes (Magnusson et al., 2005). Following denervation, a marked increase occurs in the mRNAs of the myogenesis regulatory factors and their corresponding proteins that play a key role in skeletal muscle myogenic processes (Buonanno et al., 1992; Hyatt et al., 2003).

In our study, satellite cells appear to have responded to the soleus muscle extract, but not to the EDL muscle extract. Furthermore, as the response was greater for the soleus muscle and for the denervated soleus muscle extracts, this suggests that red muscle must have greater myogenic potency. It has been shown that the myogenic response differs between both muscles following denervation, which appears to be related to a greater reliance on factors linked to neural control in the soleus muscle (Hyatt et al., 2006). However, it is not clear why the activity-dependent neural influence on the differentiation of satellite cells is greater in slow-twitch than in fast-twitch muscles (Hyatt et al., 2006) and our results may support this fact. At least in our model, in an intact and functional satellite cell population, factors derived from denervated soleus muscle provoked *in vivo*, in the two muscles studied, an increase in the size of the muscle fibers and a greater myogenic response in the soleus muscle compared with the EDL. However, we should not exclude that the increased response could also be facilitated due to the greater number of satellite cells in the soleus muscle (Gibson and Schultz, 1982) and their capability to differentiate earlier than those derived from EDL muscle (Ono et al., 2010).

If the signals contained in the extract activate satellite cells, they may also have activated the differentiation of other additional populations with myogenic potential existing in skeletal muscle. The observation of desmin+ cells, isolated or in small groups, in the interstitial space suggests that this occurred in our experiment, as all interstitial cells in normal muscle are negative for desmin (Zhang and McLennan, 1994). Given that the soleus muscle demonstrated a higher number of these cells compared with the EDL, this suggests that the soleus muscle may have an additional population of myogenic cells larger than that of the EDL. This possibility should be considered, as there is evidence that demonstrates that pericytes represent a population in skeletal muscle with myogenic capacity (Dellavalle et al., 2007, 2011). Furthermore, it is known

that the soleus muscle has a higher capillary density than EDL (Kubinova et al., 2001). Ultrastructural analysis showed morphological characteristics that correspond with pericytes, such as their cytological features, being completely surrounded by basal lamina and their location near capillaries. Cells ultrastructurally similar to these have been observed in denervated muscle (de Maruenda and Franzini-Armstrong, 1978), in muscle grafts regrafted into their own beds (Mong, 1988), in biopsies of malnourished children (Hansen-Smith et al., 1979), and in Werdnig-Hoffman's disease (van Haelst, 1970). Currently, emphasis is placed on the juxtavascular position of the satellite cells (Christov et al., 2007; Mounier et al., 2011) and as a source of supply of new satellite cells (Dhawan and Rando, 2005).

In conclusion, the present study suggests that muscular atrophic and hypertrophic responses depend, at least in part, on the specific factors contained in the muscle type which appear to be controlled by its innervation. We believe that these results may be important to try to stimulate myogenesis in pathological conditions that affect skeletal muscle. Additionally, our model may also be useful to study the myogenic activation of other cells, different from satellite cells, as it does not alter the muscle structure as in other models of injury.

References

- Armstrong R.B. and Phelps R.O. (1984). Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am. J. Anat.* 171, 259-272.
- Bakou S., Guigand L., Apreutese R., Apreutese A., Wyers M. and Cherel Y. (2014). Myocytes changes and satellite cells proliferation following denervation of ald (anterior latissimus dorsi) and pld (posterior latissimus dorsi) muscles in two strains of turkey (*Meleagris gallopavo*). *J. Vet. Anat.* 7, 89-111.
- Baranska W., Baran W., Skopinski P. and Ziembra H. (1997). Morphometric analysis of satellite cells in rat skeletal muscles: Soleus and extensor digitorum longus. *Acta Anat. (Basel)* 160, 88-94.
- Bassaglia Y. and Gauthier J. (1995). Fast and slow rat muscles degenerate and regenerate differently after whole crush injury. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 16, 420-429.
- Bobinac D., Malnar-Dragojevic D., Bajek S., Soic-Vranic T. and Jerkovic R. (2000). Muscle fiber type composition and morphometric properties of denervated rat extensor digitorum longus muscle. *Croat. Med. J.* 41, 294-297.
- Borisov A.B., Dedkov E.I. and Carlson B.M. (2001). Interrelations of myogenic response, progressive atrophy of muscle fibers, and cell death in denervated skeletal muscle. *Anat. Rec.* 264, 203-218.
- Bornemann A., Maier F. and Kuschel R. (1999). Satellite cells as players and targets in normal and diseased muscle. *Neuropediatrics* 30, 167-175.
- Buonanno A., Apone L., Morasso M.I., Beers R., Brenner H.R. and Eftimie R. (1992). The myod family of myogenic factors is regulated by electrical activity: Isolation and characterization of a mouse myf-5 cDNA. *Nucleic Acids Res.* 20, 539-544.
- Carpenter S. and Karpati G. (2001). General aspects of skeletal muscle biology. In: *Pathology of skeletal muscle*. Carpenter S. and Karpati G. (eds). Oxford University Press, New York. pp 28-62.
- Carter E.E., Thomas M.M., Muryinka T., Rowan S.L., Wright K.J., Huba E. and Hepple R.T. (2010). Slow twitch soleus muscle is not protected from sarcopenia in senescent rats. *Exp. Gerontol.* 45, 662-670.
- Christov C., Chretien F., Abou-Khalil R., Bassez G., Vallet G., Authier F.J., Bassaglia Y., Shinin V., Tajbakhsh S., Chazaud B. and Gherardi R.K. (2007). Muscle satellite cells and endothelial cells: Close neighbors and privileged partners. *Mol. Biol. Cell* 18, 1397-1409.
- Comella J.X., Sanz-Rodriguez C., Aldea M. and Esquerda J.E. (1994). Skeletal muscle-derived trophic factors prevent motoneurons from entering an active cell death program *in vitro*. *J. Neurosci.* 14, 2674-2686.
- Darr K.C. and Schultz E. (1987). Exercise-induced satellite cell activation in growing and mature skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 63, 1816-1821.
- de Maruenda E.C. and Franzini-Armstrong C. (1978). Satellite and invasive cells in frog sartorius muscle. *Tissue Cell* 10, 749-772.
- Dedkov E.I., Borisov A.B. and Carlson B.M. (2003). Dynamics of postdenervation atrophy of young and old skeletal muscles: Differential responses of fiber types and muscle types. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 58, 984-991.
- Dellavalle A., Maroli G., Covarello D., Azzoni E., Innocenzi A., Perani L., Antonini S., Sambasivan R., Brunelli S. and Tajbakhsh S. (2011). Pericytes resident in postnatal skeletal muscle differentiate into muscle fibres and generate satellite cells. *Nat. Commun.* 2, 499.
- Dellavalle A., Sampaolesi M., Tonlorenzi R., Tagliafico E., Sacchetti B., Perani L., Innocenzi A., Galvez B.G., Messina G., Morosetti R., Li S., Belicchi M., Peretti G., Chamberlain J.S., Wright W.E., Torrente Y., Ferrari S., Bianco P. and Cossu G. (2007). Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 255-267.
- Dhawan J. and Rando T.A. (2005). Stem cells in postnatal myogenesis: Molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. *Trends Cell Biol.* 15, 666-673.
- Dubowitz V. and Sewry C.A. (2007). *Muscle biopsy: A practical approach*. Saunders Elsevier China pp 21-39.
- Ehrhardt J. and Morgan J. (2005). Regenerative capacity of skeletal muscle. *Curr. Opin. Neurol.* 18, 548-553.
- Gibson M.C. and Schultz E. (1982). The distribution of satellite cells and their relationship to specific fiber types in soleus and extensor digitorum longus muscles. *Anat. Rec.* 202, 329-337.
- Gordon T., Putman C.T. and Hegedus J. (2007). Amyotrophic lateral sclerosis: Evidence of early denervation of fast-twitch muscles. *Basic Appl. Myol.* 17, 141-145.
- Guth L. and Watson P.K. (1967). The influence of innervation on the soluble proteins of slow and fast muscles of the rat. *Exp. Neurol.* 17, 107-117.
- Hansen-Smith F.M., Picou D. and Golden M.H. (1979). Muscle satellite cells in malnourished and nutritionally rehabilitated children. *J. Neurol. Sci.* 41, 207-221.
- Hyatt J.P., Roy R.R., Baldwin K.M. and Edgerton V.R. (2003). Nerve activity-independent regulation of skeletal muscle atrophy: Role of myod and myogenin in satellite cells and myonuclei. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 285, C1161-1173.
- Hyatt J.P., Roy R.R., Baldwin K.M., Wernig A. and Edgerton V.R. (2006). Activity-unrelated neural control of myogenic factors in a slow muscle. *Muscle Nerve* 33, 49-60.

Muscle extracts and atrophy or hypertrophy of skeletal muscle

- Jimena I., Pena J., Luque E. and Vaamonde R. (1993). Muscle hypertrophy experimentally induced by administration of denervated muscle extract. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 52, 379-386.
- Jimena I., Pena J., Luque E., Ayuso F. and Vaamonde R. (1998). Myotrophic effects of muscle extracts obtained at different intervals after denervation. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 24, 217-223.
- Kubinova L., Janacek J., Ribaric S., Cebasek V. and Erzen I. (2001). Three-dimensional study of the capillary supply of skeletal muscle fibres using confocal microscopy. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 22, 217-227.
- Lagord C., Soulet L., Bonavaud S., Bassaglia Y., Rey C., Barlovatz-Meimon G., Gautron J. and Martelly I. (1998). Differential myogenicity of satellite cells isolated from extensor digitorum longus (edl) and soleus rat muscles revealed *in vitro*. *Cell Tissue Res.* 291, 455-468.
- Lawson-Smith M.J. and McGeachie J.K. (1998). The identification of myogenic cells in skeletal muscle, with emphasis on the use of tritiated thymidine autoradiography and desmin antibodies. *J. Anat.* 192 (Pt 2), 161-171.
- Luque E., Ruz-Caracuel I., Medina F.J., Leiva-Cepas F., Aguera E., Sanchez-Lopez F., Lillo R., Aguilar-Luque M., Jimena I., Tunez I. and Pena J. (2015). Skeletal muscle findings in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Pathol. Res. Pract.* 211, 493-504.
- Magnusson C., Svensson A., Christerson U. and Tagerud S. (2005). Denervation-induced alterations in gene expression in mouse skeletal muscle. *Eur. J. Neurosci.* 21, 577-580.
- Martin D., Merkel E., Tucker K.K., McManaman J.L., Albert D., Relton J. and Russell D.A. (1996). Cachectic effect of ciliary neurotrophic factor on innervated skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 271, R1422-1428.
- Matsuda R., Spector D.H. and Strohman R.C. (1983). Regenerating adult chicken skeletal muscle and satellite cell cultures express embryonic patterns of myosin and tropomyosin isoforms. *Dev. Biol.* 100, 478-488.
- Mong F.S. (1988). Satellite cells in the regenerated and regrafted skeletal muscles of rats. *Experientia* 44, 601-603.
- Mounier R., Chretien F. and Chazaud B. (2011). Blood vessels and the satellite cell niche. *Curr. Top. Dev. Biol.* 96, 121-138.
- Ono Y., Boldrin L., Knopp P., Morgan J.E. and Zammit P.S. (2010). Muscle satellite cells are a functionally heterogeneous population in both somite-derived and branchiomeric muscles. *Dev. Biol.* 337, 29-41.
- Pena J., Jimena I., Luque E. and Vaamonde R. (1995). New fiber formation in rat soleus muscle following administration of denervated muscle extract. *J. Neurol. Sci.* 128, 14-21.
- Schmalbruch H. and Lewis D.M. (2000). Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle Nerve* 23, 617-626.
- Valmier J., Tafti M. and Baldy-Moulinier M. (1990). Skeletal muscle extracts promote the survival of neurofilament-positive mammalian sensory neurons. *Neurosci. Lett.* 114, 39-44.
- van Haelst U. (1970). An electron microscopic study of muscle in werdnig-hoffmann's disease. *Virchows Arch. (A)* 351, 291-305.
- Weber F.L. Jr, Macechko P.T., Kelson S.R., Karajiannis E. and Hassan M.O. (1992). Increased muscle protein catabolism caused by carbon tetrachloride hepatic injury in rats. *Gastroenterology* 102, 1700-1706.
- Yoshimura K. and Harii K. (1999). A regenerative change during muscle adaptation to denervation in rats. *J. Surg. Res.* 81, 139-146.
- Zhang M. and McLennan I.S. (1994). Use of antibodies to identify satellite cells with a light microscope. *Muscle Nerve* 17, 987-994.

Accepted April 19, 2016



Original article

Denervated muscle extract promotes recovery of muscle atrophy through activation of satellite cells. An experimental study

Eduardo Agüera ^{a,1}, Salvador Castilla ^{b,1}, Evelio Luque ^c, Ignacio Jimena ^c,
Ignacio Ruz-Caracuel ^{c,2}, Fernando Leiva-Cepas ^c, José Peña ^{c,*}

^a Department of Neurology, Maimonides Institute for Biomedical Research IMIBIC, Reina Sofia University Hospital, University of Cordoba, Córdoba 14004, Spain

^b Department of Critical Care and Emergency, Reina Sofia University Hospital, University of Cordoba, Córdoba 14004, Spain

^c Department of Morphological Sciences, Section of Histology, Faculty of Medicine and Nursing, Maimonides Institute for Biomedical Research IMIBIC, Reina Sofia University Hospital, University of Cordoba, Córdoba 14004, Spain

Received 28 September 2016; revised 31 January 2017; accepted 26 March 2017

Available online

Abstract

Background: The objective of the present study was to determine whether a denervated muscle extract (DmEx) could stimulate satellite cell response in denervated muscle.

Methods: Wistar rats were divided into 4 groups: normal rats, normal rats treated with DmEx, denervated rats, and denervated rats treated with DmEx. The soleus muscles were examined using immunohistochemical techniques for proliferating cell nuclear antigen (PCNA), desmin, and myogenic differentiation antigen (MyoD), and electron microscopy was used for analysis of the satellite cells.

Results: The results indicate that while denervation causes activation of satellite cells, DmEx also induces myogenic differentiation of cells localized in the interstitial space and the formation of new muscle fibers. Although DmEx had a similar effect in nature on innervated and denervated muscles, this response was of greater magnitude in denervated vs. intact muscles.

Conclusion: Our study shows that treatment of denervated rats with DmEx potentiates the myogenic response in atrophic denervated muscles.

© 2017 Production and hosting by Elsevier B.V. on behalf of Shanghai University of Sport. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Keywords: Muscle atrophy; Muscle denervation; Muscle extract; Myogenic response; Satellite cell; Skeletal muscle

1. Introduction

Achieving the stimulation of myogenesis in patients with neurogenic disorders, both intrinsic and traumatic, remains an important challenge.¹ Satellite cells are considered to be primarily responsible for the myogenic response in postnatal growth, hypertrophy, and postinjury regeneration.² For this reason efforts are directed to stimulate these cells to, for example, delay sarcopenia and enhance, in various clinical situations, muscle regeneration or recovery of muscle atrophy. Therefore, to know the behavior and interaction of these cells

with their environment in these situations is essential to the design of therapies for injuries and neuromuscular disorders.^{3–5}

It is known that one of the factors that controls satellite cell activity is innervation^{6–9} and that reactivation of myogenesis is initiated following denervation of adult skeletal muscle.^{10–12} This re-establishment of embryonic conditions potentially causes denervated muscle to be very active at both the cellular and molecular level and although the corresponding muscle mass decreases with time post-denervation, the muscles conserve a certain recovery capacity.¹³ In this context, a denervated muscle should be, at least initially, a rich source of signals to activate myogenic cell precursors, as it is also regenerates muscle.¹⁴ This hypothesis would explain the evidence for myogenesis observed in both human biopsies with neurogenic muscular atrophy¹⁵ and animal models of muscular atrophy due to denervation,^{11,13,16–18} where new muscular fibers are frequently found. It is not clear whether denervation transiently affects satellite cell activity directly via factors liberated from

Peer review under responsibility of Shanghai University of Sport.

* Corresponding author.

E-mail address: cm1peamj@uco.es (J. Peña)

¹ Both authors contributed equally to this work.

² Present address: Department of Pathology, Hospital Universitario La Paz, IDIPAZ, Madrid, Spain.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jshs.2017.05.007>

2095-2546/© 2017 Production and hosting by Elsevier B.V. on behalf of Shanghai University of Sport. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

the muscle fibers or from the nerve injury itself.^{7,19–22} A deficit of these factors has been proposed as possibly being responsible, at least in part, for a limited availability of satellite cells^{23,24} or for their incapacity to fuse with muscle fibers, which contributes, in this way, to an abortive restorative response.^{25,26}

Therefore, it is clear that skeletal muscle maintains, at least for a certain period of time, its ability to restore after the loss of innervation. This finding is important to the search for strategies that take advantage of this situation to stimulate myogenic capacity and enhance the rehabilitation of affected muscles. Recently van der Meer et al.²⁷ reported that when conditions associated with denervation occur, it is advisable to commence treatment of atrophy as early as possible while the number of ribosomes and satellite cells remain elevated and full-scale atrophy has not yet been established. We have demonstrated in previous studies that an extract obtained from denervated soleus muscle has myotrophic effects on normal soleus muscles in rats,^{28,29} which promotes the activation of satellite cells.^{30,31} However, it remains to be established whether similar effects also occur in short-term denervated muscles.

The purpose of this study was, therefore, to examine the satellite cell response in short-term denervated rat soleus muscle when treated with extract from denervated soleus muscle. It was hypothesized that the combination of denervation and treatment with denervated muscle extract (DmEx) could enhance the response of satellite cells in these muscles. Our findings could be of clinical interest as they suggest therapeutic applications in various neuromuscular pathologies.

2. Materials and methods

2.1. Animals and experimental design

In this study a total of 46 male Wistar rats (approximately 60 days old and weighting 250–300 g) were used. The rats were housed in temperature controlled boxes (24°C) with a light-dark cycle of 12–12 hours and fed *ad libitum*. All procedures described in this study were approved by the Bioethics Committee of the University of Cordoba.

Sixteen rats were divided into 4 groups of 4 rats each: (1) a control group of normal rats (NR); (2) a group of denervated rats (DR) subjected to bilateral transection of sciatic nerves; (3) a group of normal rats treated with DmEx (NR + DmEx); (4) and a group of denervated rats treated with DmEx (DR + DmEx). In the groups NR + DmEx and DR + DmEx, the rats were injected intraperitoneally with 1 mL of extract for 10 consecutive days; in the latter group, the treatment began immediately following denervation. This treatment period was chosen based on the fact that during this time the denervated muscle is in a more favorable biological situation to be recovered from atrophy.^{27,32} The rats into the two control groups (NR and DR) were injected intraperitoneally with 1 mL of physiological saline solution over the same experimental period.

2.2. Denervated muscle extract

The remaining 30 rats in the study were used to obtain DmEx as previously described.²⁸ All the rats underwent complete bilateral transection of the sciatic nerves (from which a

10-mm long segment was extracted). Both soleus muscles were excised 4 days post-denervation, as previous studies had found that extracts obtained during this time period had a greater myotrophic effect.²⁹ Briefly, the muscles were minced, homogenized in PBS (4°C), centrifuged at 4000 rpm (5 min), and filtered successively through 5 µm and 3 µm Millipore filters (White GSWP 25 mm, Bedford MA, USA); the resulting material was then centrifuged at 8000 rpm (3 min) and the supernatant successively filtered through 0.8 µm, 0.45 µm, and 0.22 µm Millipore filters.

2.3. Tissue preparation

One day after the last treatment dose, rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of 75 mg of Ketamine (Imalgene 100 mg/mL, Merial Laboratories, Lyon, France) and killed by decapitation. Soleus muscles of both limbs were excised and the muscle belly was mounted transversely and rapidly frozen in isopentane cooled by liquid nitrogen. Transverse serial sections, 8-µm thick, were obtained in a cryostat at –20°C, and stained with hematoxylin-eosin for general histologic examination and acridine orange (AO) to identify regenerative or newly-formed fibers.³³ Additional sections were immunohistochemically stained with primary antibodies specific against desmin (1:50, Desmin, DE-R-11, Dako, Glostrup Denmark), which are used as a marker of activated myogenic precursor cells in the early phases;^{34,35} myogenic differentiation antigen (MyoD) (1:50; Dako Glostrup), which is used for labeling activated satellite cells;²⁰ and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (1:100; Dako), which is used as a marker for dividing cells.³⁵ The reaction product was visualized using the biotin-avidin peroxidase method (K0679; Dako). Negative controls were performed in parallel without primary antibodies. Nuclei counterstaining was performed with Mayer's hematoxylin.

Small muscle fragments were fixed in 2.5% glutaraldehyde during 24 h. Samples were post-fixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated with acetones, and embedded in araldite. Ultrathin sections 60-nm thick were obtained in an ultramicrotome, stained with uranyl acetate and lead citrate, and examined using a Philips CM10 Transmission electron microscope (Central Research Support Service, SCAI, University of Cordoba, Spain).

2.4. Morphometric analysis

Histologic and immunohistochemical sections were photographed with a Nikon Eclipse E1000 microscope (Nikon, Tokyo, Japan) that incorporated a Sony DXC-990P color video camera (Sony, Tokyo, Japan) and images were transferred to a computer equipped with the image analysis software Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Bethesda, MA, USA). Five fields per section were randomly photographed at 200× magnification (157,500 µm²) and designated for quantitative analyses.

An average of 150 muscle fibers per sample was manually traced in a blind fashion by the same experienced investigator and used for measurement of the following parameters: (1) fiber cross-sectional area (µm²) in sections stained with hematoxylin-eosin; (2) number of desmin + sections, desmin + interstitial cells, and desmin + muscle fibers per area in sections

stained with desmin; (3) number of MyoD + nuclei per area in sections stained with MyoD; and (4) number of PCNA + nuclei per area in sections stained with PCNA.

Satellite cells were identified with electron microscopy and photographed at magnifications ranging between 4000× and 6000×. Selection criteria of these cells were (1) nucleus with abundant heterochromatin and (2) a position between basal and plasma membranes of the muscle fiber. The percentage of satellite cells was determined by counting the number of satellite cells and myonuclei and dividing the number of satellite-cell nuclei by the total number of nuclei (satellite cell nuclei + myonuclei). The counts for each of 5 sections per muscle were analyzed and a mean percentage of satellite cells per muscle was calculated. Once identified and quantified, the following morphometric parameters were obtained: cell area (μm^2), nucleus area (μm^2), and percentage of activated satellite cells. Activated satellite cells were considered to be those with a ratio of nucleus area to cell area greater than that quantified for the satellite cell population in normal rats.

2.5. Statistical analysis

For the statistical study SigmaStat 3.1 software package (Systat Software Inc., Point Richmond, CA, USA) was used. For each experimental group, data are expressed as means \pm SE (of the 4 rats of each group). Statistical significance ($p < 0.05$) between groups was determined by ANOVA on ranks. In those samples that met normality criteria, the Student-Newmann-Keuls test was performed and in the rest the Dunn test was used.

3. Results

3.1. Light microscopy

In the AO staining, muscle sections of the NR group showed normal histology and no significant changes were evident in the denervated muscles of the DR group, with the exception of a smaller size and less rounded profiles (Fig. 1A, B). In contrast, the groups treated with the DmEx demonstrated histologic changes that included larger muscle fibers with an apparent increase in the number of nuclei, larger and rounded, together with the presence of scattered small fibers (Fig. 1C, D).

Morphometric analysis showed a significant muscle fiber atrophy ($p < 0.05$) in the DR group ($1230.9 \pm 16.9 \mu\text{m}^2$) compared to the NR group ($2809.2 \pm 18.1 \mu\text{m}^2$), which represented a 67% reduction in size. In both groups treated with DmEx, muscle fiber areas increased significantly ($p < 0.05$), representing an upward trend of 28% for NR + DmEx rats ($3602.1 \pm 25.9 \mu\text{m}^2$) and a 59% for DR + DmEx rats ($1967.1 \pm 22.8 \mu\text{m}^2$) compared with NR and DR groups, respectively. Thus, the myotrophic effect of the DmEx was more extensive on denervated than on control muscle fibers based on the greater increase in the percentage.

While no positives were observed for any of the immuno-histochemical markers used in muscles of the NR group, in the groups DR, NR + DmEx, and DR + DmEx they were detected (Fig. 2). MyoD + nuclei were observed both in interstitium and inside muscle fibers (Fig. 2A), being significantly more abundant in the groups treated with DmEx than in the DR group

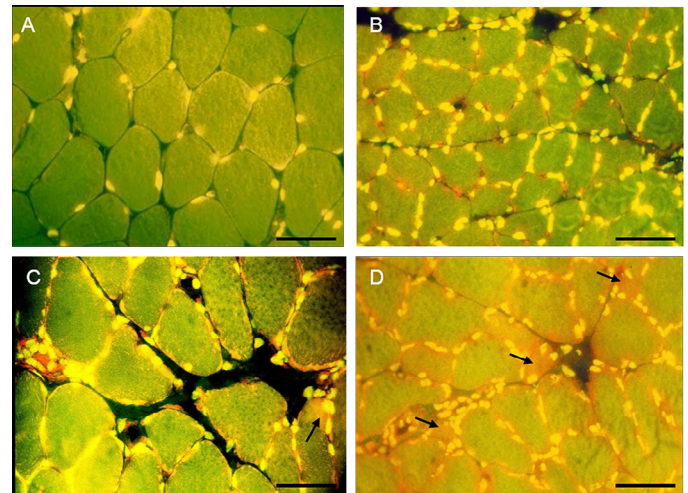


Fig. 1. Histochemistry of nuclei acids in muscle fibers. Comparison of soleus muscle sections stained by acridine orange of representative animals of NR (A), DR (B), NR + DmEx (C), and DR + DmEx (D) groups. Normal muscle fibers exhibit green background staining of cytoplasm and yellow DNA of nuclei. The muscle fibers with areas with increased concentration of RNA show a bright orange fluorescence. Note differences in muscle fiber size and number of nuclei among groups. Small fibers with orange fluorescence (arrows) are observed only in the groups treated with DmEx (C, D). Scale bars = 40 μm . DmEx = denervated muscle extract; DR = denervated rats; NR = normal rats.

(Fig. 2D). Nonetheless, this increase was 5 times higher in the DR + DmEx group than in the NR + DmEx (Fig. 2D). The majority of the PCNA + nuclei were located in the interstitium and were only occasionally visible in the muscle fiber periphery (Fig. 2B). The number of PCNA + nuclei was significantly higher ($p < 0.05$) in the groups treated with DmEx, particularly in the DR + DmEx group (Fig. 2D).

Anti-desmin staining revealed the existence of positive profiles in the periphery of some muscle fibers that contained nuclei (Fig. 2C) and the presence, preferentially in the perimysial space, of mononucleated cells and desmin-positive small muscle fibers (Figs. 2C, 3A–B). With the exception of the NR group, these profiles were observed in all 3 other groups. But while there were no significant differences between the 2 groups treated with DmEx, differences were found between DR and DR + DmEx groups and between DR and NR + DmEx groups (Fig. 2D). The small fibers were preferentially located on the edges of the muscle fascicles and many of them showed basophilia and orange fluorescence with AO (Fig. 1D). Their presence was limited to the 2 groups treated with extract and was significantly more frequent in the DR + DmEx group (Fig. 3C).

Therefore, it was evident that denervation evoked a myogenic response in the skeletal muscle of the DR group. A similar, but significantly different, response also occurred in the NR + DmEx group. Finally, with the exception of the number of desmin-positive profiles, this response was of much greater magnitude in the DR + DmEx group, but no significant difference was found between the 2 groups treated with DmEx.

3.2. Electron microscopy

Satellite cells in the NR group were always observed between the basal lamina and the plasma membrane of muscle

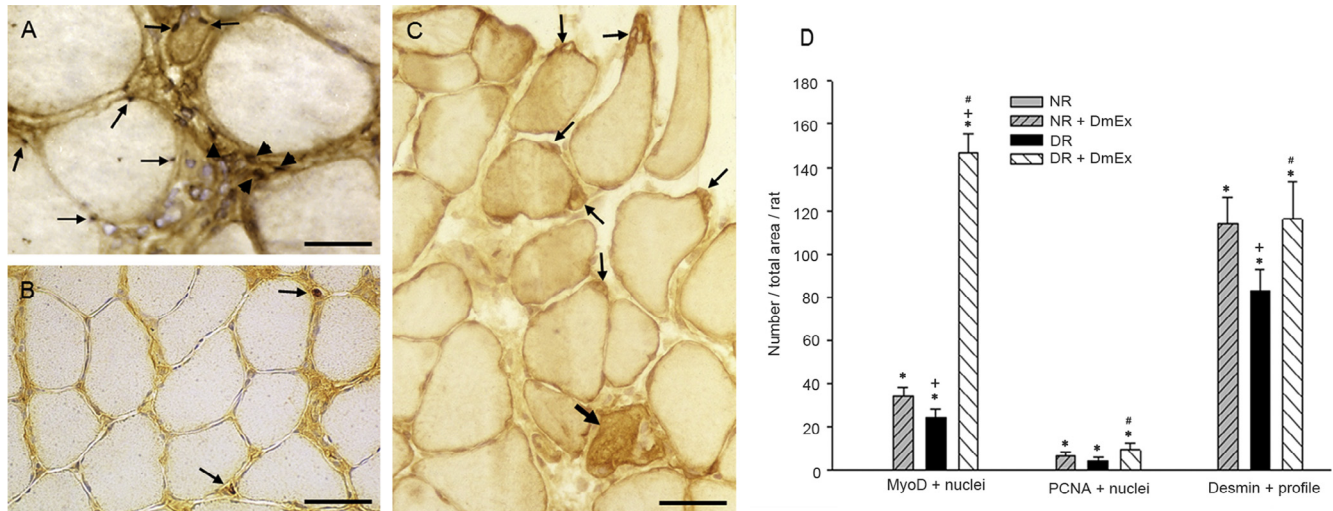


Fig. 2. Immunohistochemistry of the myogenic response. Transverse soleus muscle sections stained by immunohistochemistry against MyoD (A), PCNA (B), and desmin (C) in representative animals of the DR + DmEx group; hematoxylin counterstain. (A) MyoD labeled nuclei are observed in muscle fibers (arrows) and arranged in groups in the interstitial space (arrow heads). (B) Only 2 PCNA + nuclei are observed in the interstitium (arrows). (C) A few muscle fibers exhibit desmin immunoreactivity in peripheral areas, which contains nuclei that are suggestive of activated satellite cells (thin arrows) and other muscle fiber is heavily stained with desmin (thick arrow). Scale bars = (A) 18 μ m, (B) 40 μ m, (C) 25 μ m. (D) Quantitative expression of markers MyoD, PCNA (nuclei), and desmin (satellite cell profile) in the 4 experimental groups tested in the study. *Significantly different from NR group; †significantly different from NR + DmEx group; #significantly different from DR group. Values are means \pm SE, n = 4 rats/group. Values not detected in NR group. DmEx = denervated muscle extract; DR = denervated rats; MyoD = myogenic differentiation antigen; NR = normal rats; PCNA = proliferating cell nuclear antigen.

fibers, but they never contacted with muscle fibers nor did they show surface protrusion. They were consistently found in a resting state and were characterized by a heterochromatic nucleus and scarce cytoplasm (Fig. 4A). In contrast, in the DR, NR + DmEx, and DR + DmEx groups, activated satellite cells were often observed (Fig. 4B–D), some of which demonstrated what appeared to be areas or points of fusion that corresponded with areas of continuity between the satellite cell cytoplasm and the sarcoplasm of muscle fibers (Fig. 4D). The cytoplasm was large and contained rough endoplasmic reticulum profiles, free ribosomes, polyribosomes, mitochondria, and occasionally contained Golgi apparatus and centrioles (Fig. 4B–D).

Activation of satellite cells, which could relate well with desmin-positive profiles, was confirmed morphometrically upon the basis of significant enlargements of the cellular area ($p < 0.05$) in groups NR + DmEx ($8.2 \pm 3.1 \mu\text{m}^2$), DR ($7.9 \pm 2.0 \mu\text{m}^2$), and DR + DmEx ($10.6 \pm 5.8 \mu\text{m}^2$) when compared to the NR group ($7.5 \pm 2.2 \mu\text{m}^2$). This variable was significantly higher in the DR + DmEx group than in both DR and NR + DmEx groups ($p < 0.05$). However, this increase occurred at the expense of the satellite-cell cytoplasm because the size of the nucleus did not show significant differences between the groups NR ($4.47 \pm 1.11 \mu\text{m}^2$), DR ($4.38 \pm 1.32 \mu\text{m}^2$), NR + DmEx ($4.39 \pm 1.27 \mu\text{m}^2$), and DR + DmEx ($4.53 \pm 1.80 \mu\text{m}^2$).

With the exception of the NR group, activation occurred in all the other groups, but never affected all satellite cells observed. While in the DR group, 40% of these cells showed ultrastructural features of activation, in the NR + DmEx and DR + DmEx groups, the percentage reached 58% and 61%, respectively. In the latter case, it is important to highlight that the satellite-cell population reaction within the same muscle

was not homogenous. Thus, while some satellite cells showed clear morphologic features of activation, others had characteristics of inactivity.

Quantitative analysis showed a significant increase ($p < 0.05$) in the number of nuclei and myonuclei per fiber similar in the NR + DmEx (2.41 ± 0.39 nuclei/fiber and 2.15 ± 0.27 myonuclei/fiber), DR (2.92 ± 0.59 nuclei/fiber and 2.54 ± 0.40 myonuclei/fiber), and DR + DmEx (2.87 ± 0.43 nuclei/fiber and 2.30 ± 0.38 myonuclei/fiber) groups, in comparison with the NR group (1.32 ± 0.29 nuclei/fiber and 1.24 ± 0.17 myonuclei/fiber). The frequency of satellite cells was also increased in the 3 groups compared to the control NR, but muscles in the DR + DmEx group showed the greatest increase (Fig. 4E).

Only in the groups treated with DmEx, but not in the 2 untreated groups, satellite cells (or cells in a “satellite” position), showed some morphologic traits outstanding. Thus, they were detected cells “embraced” by papillary projections of the adjacent muscle fiber (Fig. 5A–B) or very close to the muscle fiber surface (Fig. 5C). In all of these cases, morphologic variations of the basal lamina were also observed, which included the presence of a basal lamina between the satellite cell and the muscle fiber (Fig. 5A–C).

In the interstitial space, pericytes-like cells that had ample cytoplasm with organelles and maintained their basal lamina were only observed in the 2 groups treated with DmEx and were found clearly apart from the capillary (Fig. 5D). Mononucleated cells were also found in the interstitium, and they were reminiscent of satellite cells, with heterochromatic nuclei and scarce cytoplasm with pinocytotic vesicles. Nevertheless, although close to the muscle fiber, they were isolated and completely enveloped by basal lamina.

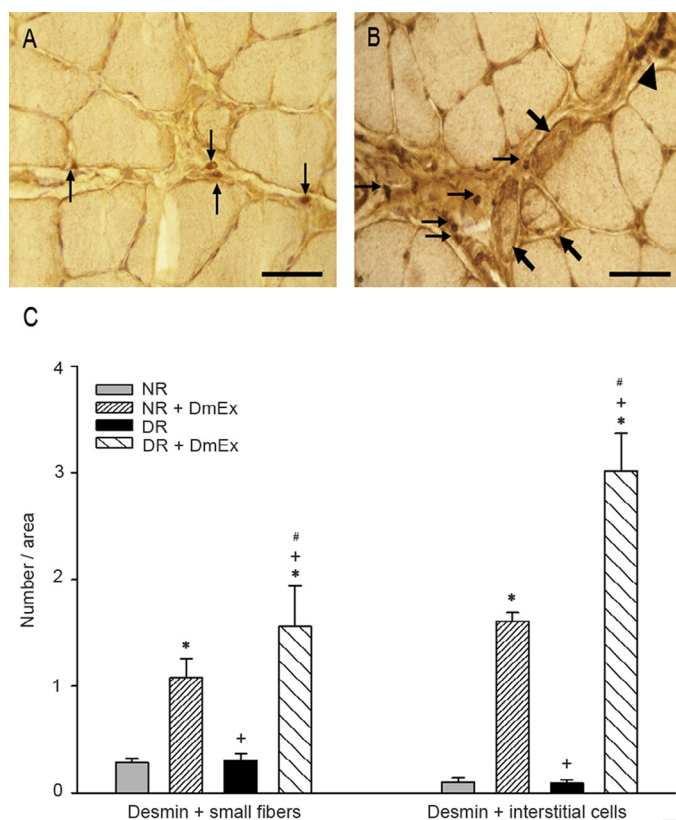


Fig. 3. Immunohistochemistry of the myogenic response into interstitial space. Transverse soleus sections stained by immunohistochemistry against desmin in representative animals of NR + DmEx (A) and DR + DmEx (B) groups; hematoxylin counterstain. (A) Arrows indicate desmin-positive cells in the perimysial space. (B) Several isolated (thin arrows) or in groups (arrow head) cells in the perimysium are desmin positive; 2 small muscle fibers and a protrusion of another also are marked with desmin (thick arrows). Scale bars = 40 μ m (C) Desmin immunohistochemical staining showed positivity in small muscle fibers and interstitial cells. *Significantly different from NR group; † significantly different from NR + DmEx group; #significantly different from DR group. Values are means \pm SE, n = 4 rats/group. DmEx = denervated muscle extract; DR = denervated rats; NR = normal rats.

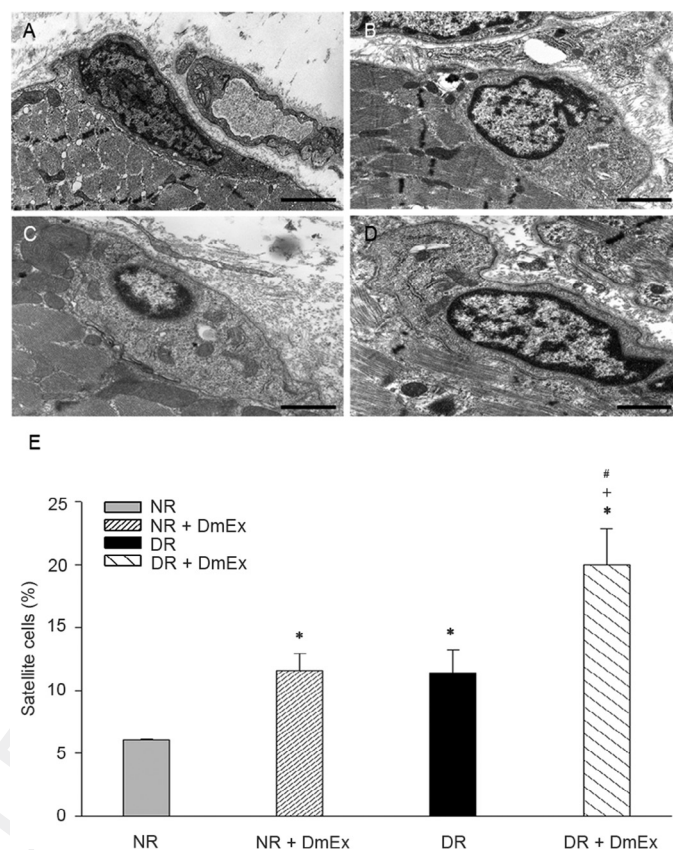


Fig. 4. Satellite cell activation and frequency. Electron micrographs of soleus muscle sections in representative animals of NR (A), DR (B), NR + DmEx (C), and DR + DmEx (D) groups. (A) Quiescent satellite cells of NR soleus muscle. (B)–(D) Active satellite cells showing a high cytoplasm to nucleus ratio when compared to satellite cell in (A). Scale bars = (A, B, C) 2 μ m; (D) 1 μ m. (E) Satellite cell frequency in the 4 experimental groups tested in the study. The proportion of satellite cells is expressed as a percentage of the total number of nuclei identifiable in the muscle fibers. *Significantly different from NR group; † significantly different from NR + DmEx group; #significantly different from DR group. Values are means \pm SE, n = 4 rats/group. DmEx = denervated muscle extract; DR = denervated rats; NR = normal rats.

4. Discussion

It is known that different types of muscle extracts contain factors capable of stimulating different cell types in muscle both *in vitro* and *in vivo*.^{36–38} We consider that the extrinsic factors contained in DmEx, and involved in the myogenic response in our case, must be proteins that act on the regulating factors of the myogenesis. In support of this idea, it has been explained that a reactivation of myogenesis results when a muscle is denervated.³⁹

Altogether, the results obtained in our study are consistent with those of previous studies^{28–31} that clearly support the concept that the liberation of trophic factors during denervation is implicated in the activation response of satellite cells. Nevertheless, it does not appear that the muscles of the NR + DmEx group have been exposed to the same factors that are found in denervated muscle. In our study, the myogenic response was of greater magnitude in the NR + DmEx vs. the DR group. These differences could be explained by the fact that DR-group rats

were sacrificed at 10 days, whereas the DmEx used were obtained at 4 days post-denervation. We have previously demonstrated that the time between denervation and obtaining the muscular extract has an impact on the extract's myotrophic effect.²⁹ Furthermore, the recovery of skeletal muscle by reinnervation following denervation is impaired when this exceeds 7 days.³²

The comparable percentage of activated satellite cells quantified in both groups treated with the DmEx (around 60%) suggests 2 important observations concerning the trophic factor (or factors) contained in this extract. First, this extract does not act in a similar way on the satellite cell population in a normal muscle and in a denervated muscle. In both cases 60% of activated satellite cells are reached; however, in the denervated muscle we started from 40% and in the normal muscle from 0%. Thus, the effect of the extract appears to be greater on normal muscle; however, no reference range has been determined for normal rats, which might be a limitation in the interpretation of our results. Second, this extract could have

activated a specific population of satellite cells. This suggestion may be justified by the fact that the total number of satellite cells capable of doing so have been activated in both cases and the existence of 2 subpopulations or compartments of satellite cells, termed proliferative and differentiative, is well known,^{19,34} and they appear to respond to signals differently.⁴⁰ Because PCNA + nuclei were seen in the interstitial space, but not in a satellite position with muscle fibers, and there was not ultrastructural evidence of satellite cell mitosis, it is possible that the DmEx only activated the differentiative compartment. In a recent experimental model of electrical stimulation to attenuate muscle disuse atrophy, it has been suggested that the requirements for satellite cells to engage in different cellular activities (quiescence-activation or proliferation-differentiation) seem to be different.⁴¹

The ultrastructural observation of fusion processes in the DR, NR + DmEx, and DR + DmEx groups, would indicate the incorporation of the satellite cell in the muscle fiber with which it is associated. It has been reported that rat DmEx contains specific factors that significantly increase the fusion of donor myoblasts with host muscle fibers.⁴² Because satellite cells serve as a source of myonuclei in both postnatal growth and muscle fiber hypertrophy,⁴³ its activation response must be linked to the myotrophic effect of the DmEx. In the NR + DmEx group, the fusion processes of satellite cells would contribute to the DmEx-induced muscle fiber hypertrophy.^{28,30} In the DR and DR + DmEx groups, however, this can be interpreted as a mechanism to compensate the myonuclear loss in atrophic muscle fibers.^{21,44–46} In our study, MyoD + nuclei were observed both associated with muscle fibers and in the interstitium; unfortunately, we cannot confirm the exact location of MyoD + nuclei, which requires additional markers such as dystrophin. This association is consistent with the increase observed in the MyoD expression in both myonuclei and satellite cells during the first week post-denervation, which was interpreted as an attempt to prevent muscle atrophy.⁴⁷ Other authors have noted that, at least in the short term, there is no loss of nuclei during atrophy in mice skeletal muscle.⁴⁸ However, in the present study the number of myonuclei per fiber volume in muscles of the DR group increased significantly with respect to the NR group. This discrepancy could be explained by the decreased fiber size observed in the DR group that at 10 days post-denervation represents 43% of the normal muscle fiber. Another possible explanation could be related to the significant increase observed in the frequency of satellite cells at 10 days post-denervation (11%) in comparison with the 6% of satellite cells that were found in normal muscle fibers. These data are consistent with the rise, from 4% to 8%, in the satellite cell population reported at 3–4 days post-denervation.²⁵

It is important to point out that while in the DR group the myogenic response was limited to satellite cells, in the DR + DmEx group this response was comparatively greater and included the appearance of myogenic cells and myofiber neoformation. The ability of denervated muscle microenvironment to be an optimal environment for myogenesis is supported by many studies, although this ability seems not to be the same for all muscles.³¹ It is known that short-term denervation provokes

tissue disruption that results in a rise in the number of both satellite and interstitial cells, probably through release of a mitogen.^{44,49} Furthermore, in experimental studies of muscle denervation^{12,50} or in muscle biopsies from patients with neurogenic disorders¹⁵ small-sized muscle fibers are often observed with staining features of immaturity. These fibers, which are different from atrophic fibers, are suggestive of an evident myogenic response. Therefore, the initiation of myogenesis could be a consequence of changes in the tissue microenvironment. Allen and Rankin⁵¹ have already pointed out that variations in the concentration of growth factors in the microenvironment play an important role in the stimulation or inhibition of satellite cells. They also revealed that another possible mechanism might be related to the different sensitivity in their response to growth factors. In our opinion, systemic extract injections could induce variations in the microenvironment of skeletal muscle tissue that could act with some myogenic potential on satellite cells or other cell types.

Despite the high number of nuclei observed in the DR group, the occasional presence of desmin-positive interstitial cells and the absence of small neofibers indicates that denervation had induced little myogenic differentiation in the interstitial zone. This apparent discrepancy may be explained by the presence of new fibers or myotubes seen in long-term denervation,^{11,12} whereas the period of denervation in the DR group of the current study was only 10 days. In contrast, in the 2 groups treated with DmEx there was a significant presence of interstitial cells and desmin-positive small muscle fibers, which were more pronounced in the DR + DmEx group than in the NR + DmEx group. This finding confirms that this type of muscular extract has the capacity to induce new formation of muscle fibers.³⁰ Despite the fact that a control group consisting of rats injected with normal (intact) muscle extract was not included in the present study, in previous studies a diminished myotrophic capacity in denervated vs. normal muscle extracts was shown.^{28,30}

In agreement with other experimental models^{52,53} the current study suggests that cells located in the interstitium participated in the neoformation of muscle fibers. Despite the inability to confirm the origin of these myogenic cells located in the extracellular space, different cell types have been implicated as potential muscle cell precursors, without excluding the consideration that interstitial myoblasts could derive from satellite cells.^{54–56} In any case, it appears that the DmEx assayed in the present study could have an intrinsic capacity to stimulate myogenic differentiation not only from satellite cells but also from other cells. It is noteworthy that stem cells derived from bone marrow have been induced to enter the myogenic lineage when cultivated with extracts from injured muscle, but not with extracts from normal muscles.⁵⁷

Among precursors having the capacity to postnatal growth, hypertrophy, and postinjury regeneration, pericytes associated with muscular capillaries appear to be a subpopulation of stem cells^{58–60} that can commit to the myogenic lineage as a consequence of the micro-environmental influence.^{14,61,62} Considering that in our model the maximal myogenic response was achieved when muscle denervation itself and DmEx were combined, this

association could result in a “forced” and “unnatural” modification of the tissue microenvironment that could act as a signal recruiting other cell types to participate in the myogenic response seen in the DR + DmEx group. Although some of our observations support the notion that pericytes could play a role in the DmEx-induced myogenic response, further studies are still necessary to confirm or discard this hypothesis.

In focal lesions, pericytes can be released from the vascular position in response to chemotactic stimuli and function as stem cells and immunomodulators.⁶³ There is now ample evidence that these cells contribute not only to regenerative processes but also as a potential source of re-population of satellite cells.^{62,64} Some of our morphologic observations also suggest that the DmEx used could have stimulated the pericytes; however, our observations cannot confirm completely that pericytes are involved in the formation of new fibers. A high number of these cells were found activated, separated, and out of their habitual location along capillaries, while preserving their basal lamina. Small cells similar to satellite cells, completely separated from the muscle-fiber surface and completely surrounded by basal lamina, were also seen in the groups treated with DmEx. Comparable cells, both in morphologic appearance and location, have been reported and associated with pericytes in previous classical studies.^{65–67} It has also been observed that, in denervation, satellite cells can leave their associated fibers via either processes of sequestration by invagination of the basal lamina between the satellite cell and the muscle fiber or by migration mechanisms crossing the basal lamina and heading toward the endomysial space.^{26,68,69} However, we believe it does not make sense that while activated satellite cells are fusing with the muscle fiber, others are abandoning it. Moreover, there should be an interposition of basal lamina between satellite cells and the muscle fiber if they were abandoning it, but these processes were not observed in the present study. Another possibility would be that they were incorporating with the muscle fiber.

The incorporation of myogenic precursors with an exogenous origin to the “satellite position” has been found in different experiments.^{70–72} The possibility has been raised that a subpopulation of satellite cells could be supplied by the migration of cells from either the interstitium or the circulation to occupy a sublaminal position.⁷³ Our observations of interstitial cells with partial loss of basal lamina and cytoplasmic projections of the muscular fiber “enveloping” mononucleated cells (Fig. 5) are compatible with the incorporation of exogenous myogenic precursors.

5. Conclusion

In conclusion, the results of the present study demonstrate that parenteral administration of an extract of denervated soleus muscle promotes in the short-term a myogenic response in denervated rat soleus muscle and could facilitate the recovery of muscle atrophy. These effects were based upon the activation of satellite cells, cells located in the interstitium, and the formation of new myofibers. It was noteworthy that while this response was of similar nature in control and denervated muscle, the size effect was of much greater magnitude in denervated vs. intact skeletal muscle. However, it should be noted

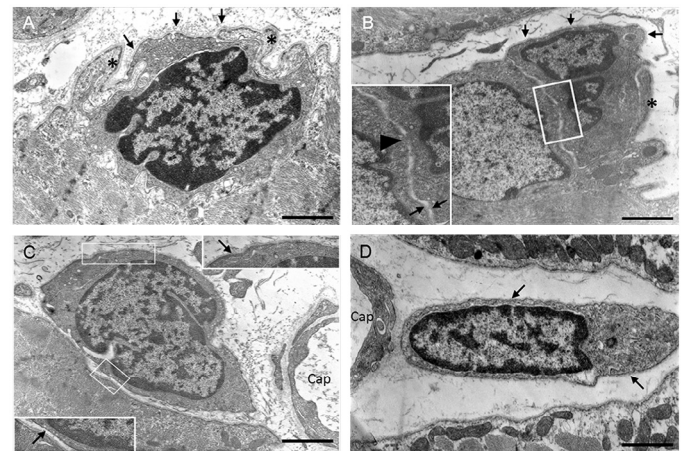


Fig. 5. Satellite cells and pericytes-like cells. Electron micrographs (DR + DmEx group) showing (A and B) a papillary projection (asterisks) of the parent muscle fiber partially covering a satellite cell externally. In both cases, the satellite cells are externally covered by basal lamina (arrows). (B) Inset: note that basal lamina seems to be between muscle fiber and satellite cell (arrows). The arrowhead marks an apparent contact patch containing pinocytotic vesicles. (C) Electron micrograph (DR + DmEx group) showing a cell very close to the surface of a muscle fiber and in the vicinity of a capillary (Cap) cell. Note that the outer side of the cell is covered by basal lamina (upper panel) but not on the side facing the muscle fiber (lower panel), which presents its basal lamina. (D) Electron micrograph (NR + DmEx group), which shows a mononuclear cell, surrounded by basal lamina (arrows) and located in the proximity of a capillary (Cap), which could be identified as a likely pericyte. Scale bars = 1 μ m. DmEx = denervated muscle extract; DR = denervated rats; NR = normal rats.

that it is possible that the effect of extracts on muscle atrophy cannot be systemic because both the effect and the response of normal muscles seem to differ depending on the type of muscle.³¹ These findings may have practical implications in the rehabilitation of neuromuscular problems requiring an improvement in myogenesis.

Authors' contributions

EA, SC, EL, and JP conceived and designed the study; EA, SC, IJ, FLC, IRC, EL, and JP performed the experiments; EA, SC, IJ, FLC, and JP obtained and analyzed the data in light microscopy; EA, SC, EL, IRC, and JP obtained and analyzed the data in electron microscopy; EA, SC, EL, IJ, and JP wrote the manuscript. All authors have read and approved the final version of the manuscript, and agree with the order of presentation of the authors.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

- Carraro U, Rossini K, Zanin ME, Rizi C, Mayr W, Kern H. Induced myogenesis in long-term permanent denervation: perspective role in functional electrical stimulation of denervated legs in humans. *Basic Appl Myol* 2002;12:53–64.

2. Yablonka-Reuveni Z. The skeletal muscle satellite cell: still young and fascinating at 50. *J Histochem Cytochem* 2011;**59**:1041–59.
3. Machida S, Booth FW. Regrowth of skeletal muscle atrophied from inactivity. *Med Sci Sports Exerc* 2004;**36**:52–9.
4. Kuang S, Rudnicki MA. The emerging biology of satellite cells and their therapeutic potential. *Trends Mol Med* 2008;**14**:82–91.
5. Gayraud-Morel B, Chrétien F, Tajbakhsh S. Skeletal muscle as a paradigm for regenerative biology and medicine. *Regen Med* 2009;**4**:293–319.
6. Bischoff R. Control of satellite cell proliferation. In: Griggs RC, Karpatis G, editors. *Myoblast transfer therapy*. New York: Plenum Press; 1990.p.147–58.
7. Bornemann A, Maier F, Kuschel R. Satellite cells as players and targets in normal and diseased muscle. *Neuropediatrics* 1999;**30**:167–75.
8. Bischoff R, Franzini-Armstrong C. Satellite and stem cells in muscle regeneration. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, editors. *Myology*. New York: McGraw-Hill; 2004.p.66–86.
9. Cornelison DD. Context matters: *in vivo* and *in vitro* influences on muscle satellite cell activity. *J Cell Biochem* 2008;**105**:663–9.
10. Buonanno A, Rosenthal N. Molecular control of muscle diversity and plasticity. *Dev Genet* 1996;**19**:95–107.
11. Borisov AB, Dedkov EI, Carlson BM. Interrelations of myogenic response, progressive atrophy of muscle fibers, and cell death in denervated skeletal muscle. *Anat Rec* 2001;**264**:203–18.
12. Dedkov EI, Kostrominova TY, Borisov AB, Carlson BM. Reparative myogenesis in long-term denervated skeletal muscles of adult rats results in a reduction of the satellite cell population. *Anat Rec* 2001;**263**:139–54.
13. Carlson BM, Borisov AB, Dedkov EI, Dow D, Kostrominova TY. The biology and restorative capacity of long-term denervated skeletal muscle. *Basic Appl Myol* 2002;**12**:247–54.
14. De Angelis L, Berghella L, Coletta M, Lattanzi L, Zanchi M, Cusella-De Angelis MG, et al. Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration. *J Cell Biol* 1999;**147**:869–78.
15. Doppler K, Mittelbronn M, Bornemann A. Myogenesis in human denervated muscle biopsies. *Muscle Nerve* 2008;**37**:79–83.
16. Schmalbruch H, Lewis DM. A comparison of the morphology of denervated with aneurally regenerated soleus muscle of rat. *J Muscle Res Cell Motil* 1994;**15**:256–66.
17. Rodrigues Ade C, Schmalbruch H. Satellite cells and myonuclei in long-term denervated rat muscles. *Anat Rec* 1995;**243**:430–7.
18. Carraro U. Modulation of trophism and fiber type expression of denervated muscle by different patterns of electrical stimulation. *Basic Appl Myol* 2002;**12**:263–72.
19. Kuschel R, Yablonka-Reuveni Z, Bornemann A. Satellite cells on isolated myofibers from normal and denervated adult rat muscle. *J Histochem Cytochem* 1999;**47**:1375–84.
20. Yoshimura K, Harii K. A regenerative change during muscle adaptation to denervation in rats. *J Surg Res* 1999;**81**:139–46.
21. Schmalbruch H, Lewis DM. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle Nerve* 2000;**23**:617–26.
22. Ehrhardt J, Morgan J. Regenerative capacity of skeletal muscle. *Curr Opin Neurol* 2005;**18**:548–53.
23. Schmalbruch H. Growth and denervation response of skeletal muscle fibers of newborn rats. *Muscle Nerve* 1990;**13**:421–32.
24. Jejurikar SS, Kuzon WM Jr. Satellite cell depletion in degenerative skeletal muscle. *Apoptosis* 2003;**8**:573–8.
25. Vigue CA, Lu DX, Huang SK, Rengen H, Carlson BM. Quantitative study of the effects of long-term denervation on the extensor digitorum longus muscle of the rat. *Anat Rec* 1997;**248**:346–54.
26. Borisov AB, Dedkov EI, Carlson BM. Abortive myogenesis in denervated skeletal muscle: differentiative properties of satellite cells, their migration, and block of terminal differentiation. *Anat Embryol (Berl)* 2005;**209**:269–79.
27. van der Meer SF, Jaspers RT, Jones DA, Degens H. Time-course of changes in the myonuclear domain during denervation in young-adult and old rat gastrocnemius muscle. *Muscle Nerve* 2011;**43**:212–22.
28. Jimena I, Peña J, Luque E, Vaamonde R. Muscle hypertrophy experimentally induced by administration of denervated muscle extract. *J Neuropathol Exp Neurol* 1993;**52**:379–86.
29. Jimena I, Peña J, Luque E, Ayuso F, Vaamonde R. Myotrophic effects of muscle extracts obtained at different intervals after denervation. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1998;**24**:217–23.
30. Peña J, Jimena I, Luque E, Vaamonde R. New fiber formation in rat soleus muscle following administration of denervated muscle extract. *J Neurol Sci* 1995;**128**:14–21.
31. Agüera E, Castilla S, Luque E, Jimena I, Leiva-Cepas F, Ruz-Caracuel I, et al. Muscular hypertrophy and atrophy in normal rats provoked by the administration of normal and denervated muscle extracts. *Histol Histopathol* 2016;**31**:1367–79.
32. Finkelstein DI, Dooley PC, Luff AR. Recovery of muscle after different periods of denervation and treatments. *Muscle Nerve* 1993;**16**:769–77.
33. Cumming WJK, Fulthorpe JJ, Hudgson P, Mahon M. *Color atlas of muscle pathology*. London: Mosby-Wolfe; 1994.p.183–8.
34. Rantanen J, Hurme T, Lukka R, Heino J, Kalimo H. Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells. *Lab Invest* 1995;**72**:341–7.
35. Lawson-Smith MJ, McGeachie JK. The identification of myogenic cells in skeletal muscle, with emphasis on the use of tritiated thymidine autoradiography and desmin antibodies. *J Anat* 1998;**192**:161–71.
36. Comella JX, Sanz-Rodriguez C, Aldea M, Esquerda JE. Skeletal muscle-derived trophic factors prevent motoneurons from entering an active cell death program *in vitro*. *J Neurosci* 1994;**14**:2674–86.
37. Bischoff R. Chemotaxis of skeletal muscle satellite cells. *Dev Dyn* 1997;**208**:505–15.
38. Chen G, Quinn LS. Partial characterization of skeletal myoblast mitogens in mouse crushed muscle extract. *J Cell Physiol* 1992;**153**:563–74.
39. Buonanno A, Cheng J, Venepally P, Weis J, Calvo S. Activity dependent regulation of muscle genes: repressive and stimulatory effects of innervation. *Acta Physiol Scand* 1998;**163**:17–26.
40. Tatsumi R, Anderson JE, Nevoret CJ, Halevy O, Allen RE. HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Dev Biol* 1998;**194**:114–28.
41. Wan Q, Yeung SS, Cheung KK, Au SW, Lam WW, Li YH, et al. Optimizing electrical stimulation for promoting satellite cell proliferation in muscle disuse atrophy. *Am J Phys Med Rehabil* 2016;**95**:28–38.
42. Cheng L, Lai MD, Sanderson JE, Yu CM, Li M. Enhanced fusion of myoblasts with myofibers for efficient gene delivery induced by a partially purified protein fraction from rat muscle extract. *Arch Biochem Biophys* 2005;**441**:141–50.
43. Allen DL, Roy RR, Edgerton VR. Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. *Muscle Nerve* 1999;**22**:1350–60.
44. McGeachie JK. Sustained cell proliferation in denervated skeletal muscle of mice. *Cell Tissue Res* 1989;**257**:455–7.
45. Carlson BM. Denervation and the aging of skeletal muscle. *Basic Appl Myol* 2004;**14**:135–9.
46. Borisov AB, Dedkov EI, Carlson BM. Differentiation of activated satellite cells in denervated muscle following single fusions *in situ* and in cell culture. *Histochem Cell Biol* 2005;**124**:13–23.
47. Ishido M, Kami K, Masuhara M. *In vivo* expression patterns of MyoD, p21, and Rb proteins in myonuclei and satellite cells of denervated rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;**287**:C484–93.
48. Gundersen K, Bruusgaard JC. Nuclear domains during muscle atrophy: nuclei lost or paradigm lost? *J Physiol* 2008;**586**:2675–81.
49. Murray MA, Robbins N. Cell proliferation in denervated muscle: time course, distribution and relation to disuse. *Neuroscience* 1982;**7**:1817–22.
50. Adami N, Biral D, Caccavale S, Rossini K. Histology of the long term denervated rat muscle. *Basic Appl Myol* 2006;**16**:113–14.
51. Allen RE, Rankin LL. Regulation of satellite cells during skeletal muscle growth and development. *Proc Soc Exp Biol Med* 1990;**194**:81–6.
52. Tamaki T, Akatsuka A, Ando K, Nakamura Y, Matsuzawa H, Hotta T, et al. Identification of myogenic-endothelial progenitor cells in the interstitial spaces of skeletal muscle. *J Cell Biol* 2002;**157**:571–7.

53. Tamaki T, Akatsuka A, Yoshimura S, Roy RR, Edgerton VR. New fiber formation in the interstitial spaces of rat skeletal muscle during postnatal growth. *J Histochem Cytochem* 2002;**50**:1097–111.
54. Schultz E. Changes in the satellite cells of growing muscle following denervation. *Anat Rec* 1978;**190**:299–311.
55. Lu DX, Huang SK, Carlson BM. Electron microscopic study of long-term denervated rat skeletal muscle. *Anat Rec* 1997;**248**:355–65.
56. Collins CA, Olsen I, Zammit PS, Heslop L, Petrie A, Partridge TA, et al. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell* 2005;**122**:289–301.
57. Santa Maria L, Rojas CV, Minguell JJ. Signals from damaged but not undamaged skeletal muscle induce myogenic differentiation of rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 2004;**300**:418–26.
58. Peng H, Huard J. Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair. *Transpl Immunol* 2004;**12**:311–19.
59. Peault B, Rudnicki M, Torrente Y, Cossu G, Tremblay JP, Partridge T, et al. Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol Ther* 2007;**15**:867–77.
60. Otto A, Collins-Hooper H, Patel K. The origin, molecular regulation and therapeutic potential of myogenic stem cell populations. *J Anat* 2009;**215**:477–97.
61. Bianco P, Cossu G. Uno, nessuno e centomila: searching for the identity of mesodermal progenitors. *Exp Cell Res* 1999;**251**:257–63.
62. Dellavalle A, Sampaolesi M, Tonlorenzi R, Tagliafico E, Sacchetti B, Perani L, et al. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol* 2007;**9**:255–67.
63. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 2008;**3**:301–13.
64. Dellavalle A, Maroli G, Covarello D, Azzoni E, Innocenzi A, Perani L, et al. Pericytes resident in postnatal skeletal muscle differentiate into muscle fibres and generate satellite cells. *Nat Commun* 2011;**2**:499. doi:10.1038/ncomms1508
65. van Haelst U. An electron microscopic study of muscle in Werdnig-Hoffmann's disease. *Virchows Arch A Pathol Pathol Anat* 1970;**351**:291–305.
66. de Maruenda EC, Franzini-Armstrong C. Satellite and invasive cells in frog Sartorius muscle. *Tissue Cell* 1978;**10**:749–72.
67. Hansen-Smith FM, Picou D, Golden MH. Muscle satellite cells in malnourished and nutritionally rehabilitated children. *J Neurol Sci* 1979;**41**:207–21.
68. Ontell M. Evidence for myoblastic potential of satellite cells in denervated muscle. *Cell Tissue Res* 1975;**160**:345–53.
69. Laule S, Bornemann A. Ultrastructural findings at the satellite cell-myofiber border in normal and diseased human muscle biopsy specimens. *Acta Neuropathol* 2001;**101**:435–9.
70. Bittner RE, Schofer C, Weipoltshammer K, Ivanova S, Streubel B, Hauser E, et al. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat Embryol (Berl)* 1999;**199**:391–6.
71. Skuk D, Vilquin JT, Tremblay JP. Experimental and therapeutic approaches to muscular dystrophies. *Curr Opin Neurol* 2002;**15**:563–9.
72. Kuang S, Kuroda K, Le Grand F, Rudnicki MA. Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell* 2007;**129**:999–1010.
73. Dhawan J, Rando TA. Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. *Trends Cell Biol* 2005;**15**:666–73.



Original Article

Skeletal muscle findings in experimental autoimmune encephalomyelitis



Evelio Luque^{a,e,1}, Ignacio Ruz-Caracuel^{a,1}, Francisco J. Medina^b, Fernando Leiva-Cepas^a, Eduardo Agüera^{c,e}, Fernando Sánchez-López^{c,e}, Rafael Lillo^{d,e}, Macarena Aguilar-Luque^b, Ignacio Jimena^{a,e}, Isaac Túnez^{b,e}, José Peña^{a,e,*}

^a Departamento de Ciencias Morfológicas (Sección de Histología), Facultad de Medicina y Enfermería, Universidad de Córdoba, Spain

^b Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina y Enfermería, Universidad de Córdoba, Spain

^c Unidad de Gestión Clínica de Neurología, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, Spain

^d Departamento de Ciencias Sociosanitarias, Radiología y Medicina Física (Sección de Psiquiatría), Facultad de Medicina y Enfermería, Universidad de Córdoba, Spain

^e Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 September 2014

Received in revised form 23 January 2015

Accepted 6 February 2015

Keywords:

Experimental autoimmune encephalomyelitis
Multiple sclerosis
Skeletal muscle
Ragged-red fibers
Mitochondria

ABSTRACT

Introduction: Skeletal muscle is a target organ in multiple sclerosis, a chronic debilitating disease of the central nervous system caused by demyelination and axonal deterioration. Since the experimental autoimmune encephalomyelitis model reproduces the relapsing-remitting course found in most multiple sclerosis patients, this model was used to compare the histological features of skeletal muscle at onset with those observed at the start of the second relapse.

Material and methods: Histological, histochemical and ultrastructural changes, as well as biochemical oxidative damage and antioxidant-system markers, were examined in the soleus and extensor digitorum longus muscles of Dark Agouti rats in which experimental autoimmune encephalomyelitis had been induced by active immunization using myelin oligodendrocyte glycoprotein.

Results: Histological examination at disease onset revealed *ragged-red* fibers and ultrastructural evidence of mitochondrial degeneration. At the second relapse, neurogenic changes included a wide range of cytoarchitectural lesions, skeletal muscle atrophy and the appearance of intermediate fibers; however, differences were observed between soleus and extensor digitorum longus lesions. Biochemical tests disclosed an increase in oxidative stress markers at onset, which was more pronounced at the second relapse.

Conclusions: Microscopic findings suggest that two patterns can be distinguished at disease onset: an initial phase characterized by muscle mitochondrial alterations, and a second phase dominated by a histological muscle pattern of clearly neurogenic origin.

© 2015 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Abbreviations: MS, multiple sclerosis; ETC, electron transport chain; MHC, myosin heavy chain; EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis; MOG, myelin oligodendrocyte glycoprotein; EDL, extensor digitorum longus; PBS, phosphate buffered saline; OG, onset group; RG, relapsing group; ATPase, adenosine triphosphatase; NADH-tr, nicotinamide adenine dinucleotide-tetrazolium reductase; SDH, succinate dehydrogenase; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione; H-E, hematoxylin-eosin.

* Corresponding author at: Departamento de Ciencias Morfológicas (Sección de Histología), Facultad de Medicina y Enfermería, Universidad de Córdoba, Spain.
Tel.: +34 957218264; fax: +34 957218246.

E-mail address: cm1peamj@uco.es (J. Peña).

¹ Both authors contributed equally to this work.

Introduction

Skeletal muscle is a target organ in multiple sclerosis (MS), a chronic neurodegenerative disease in which 65–97% of patients display neuromuscular symptoms including weakness, fatigue and spasticity [1,2]. However, published muscle biopsy findings in MS patients are both limited and contradictory. They include: muscle fiber atrophy [3,4]; change in fiber type [3,4]; reduced activity of succinate dehydrogenase (E.C. 1.3.5.1), an enzyme linking the Krebs cycle and the electron transport chain (ETC) of which it forms Complex II [3]; a greater tendency to express the fast myosin heavy chain (MHC) isoform [5]; and a reduction in ETC complex I (NADH: ubiquinone oxidoreductase, EC 1.6.5.3) activity [6]. By contrast, other authors report no changes [7].

Although experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is among the most widely used animal disease models for the study of MS, very little published research has focussed on the impact of this disease on skeletal muscle. To our knowledge, only two studies have addressed this issue, reporting – in the acute phase – evidence of muscle fiber atrophy 2–3 days after the first symptoms appear [8], and small irregular muscle fibers together with fibrosis and apoptosis 2–5 days after the onset of EAE [9]. Since MS is a progressive disease, it would be interesting to establish, using the EAE model, whether skeletal muscle might be affected at a more advanced stage. Vogt et al. [10] observed a remarkable reduction in the number of lower motor neurons (by between 47 and 74%) in some EAE models; this finding, coupled with the demyelination and axonal degeneration known to occur in EAE [11], suggests that histological neurogenic changes in the skeletal muscle may take place at any stage in the course of the disease. The present paper sought to test that hypothesis.

Histological, histochemical and electron-microscopy techniques were used to examine potential muscle pathological reactions in EAE induced by active immunization with myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG), this being among the most widely used approaches [12]. Regardless of the complex variety of clinical forms found in MS, and although a number of experimental models have been tested [13,14] this EAE model was used because it reproduces the relapsing-remitting course observed in most MS patients [15]. The aim was to compare skeletal muscle histology at disease onset with that observed at the start of the second relapse after a remission phase. Given that denervation can affect differently the muscle fibers types in both human and rat muscle [16,17], this study compared two muscles with radically different fiber-type composition: the soleus muscle contains 85–100% slow fibers, while the *extensor digitorum longus* (EDL) muscle comprises 95% fast fibers [18].

Materials and methods

Experimental design

A total of 28 male Dark Agouti rats (2 months old, weight 190–220 g) were used, since EAE in this strain bears the closest clinical and pathological resemblance to MS [19]. Experiments were approved by the University of Cordoba Bioethics Committee and were carried out in accordance with European Directive 86/609/ECC as approved by the Council of the European Communities, and with Spanish Law RD 53/2013, approved by the Minister of the Presidency (BOE 08, February 2013).

EAE induction was performed by injecting subcutaneously, at the dorsal base of the tail, 100 μ l of a solution containing 150 μ g MOG (fragment 35–55; Sigma–Aldrich, Madrid, Spain) in phosphate buffered saline (PBS) emulsified 1:1 in complete Freund's adjuvant (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA). To complete the adjuvant, 400 μ g of heat-inactivated *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra, DIFCO, Detroit, MI, USA) were added. Sham induction was performed in control-group (Sham) animals by subcutaneous injection of 100 μ l of complete Freund's adjuvant.

Animals were monitored and clinical signs were scored as follows; 0: no sign, 1: limp tail, 2: hind limb paresis, 3: hind limb paralysis, 4: front limb paresis, 5: quadriplegic [9]. Based on this clinical monitoring, a first group of animals, *onset group* (OG) ($n = 4$), was sacrificed just after the appearance of the first clinical signs, at 14 days post-induction. In order to study skeletal muscle at a more advanced and presumably more severe stage, the other rats were allowed to continue until a second relapse was recorded on the basis of clinical scoring. At this point (day 35 post-induction), animals in this *relapsing group* (RG) ($n = 8$) were sacrificed. This study

design enabled comparison of skeletal muscle features in the acute phase (OG) with those occurring at mid- to long-term (RG).

Two control groups were used: a first *control group* (Control) undergoing no intervention ($n = 8$) and a second *sham group* (Sham) inoculated with complete Freund's adjuvant alone and sacrificed at day 35 post-sham induction ($n = 8$). Animals were weighed at the start of the experiment (induction day), and at days 14 and 35 post-induction, depending on the group. Animals were kept in standard conditions with controlled temperature at 25 °C in a 12 h light/12 h dark cycle with water and food *ad libitum*.

Specimen collection

Animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of 75 mg/kg ketamine (Imalgene® 100 mg/ml, Merial Laboratorios, Lyon, France) and killed by decapitation. EDL and soleus muscles were excised and weighed. Four random animals from Control, Sham and RG groups were used for histological examination and 4 for biochemical analysis. Muscles from OG rats were distributed as follows: the right hind limb was used for histology and the left hind limb for biochemistry. The belly of the muscles used for histological examination was sectioned for light and electron microscopy. Specimens for biochemical analysis were immediately collected and frozen at –80 °C until measurements were performed.

Histological and histochemical examination

Specimens for histological and histochemical examination were embedded in OCT (Tissue-Tek®, Miles INC), flash-frozen in isopentane cooled with liquid nitrogen, and transversely sectioned at 7 μ m using a cryostat (Leica CM1850 UV) at –20 °C. Sections were stained with hematoxylin–eosin (H–E) and modified Gomori trichrome for morphological analysis. Histochemical specimens were stained for adenosine triphosphatase pH 9.6 (ATPase), nicotinamide adenine dinucleotide-tetrazolium reductase (NADH-tr), succinate dehydrogenase (SDH) and acid phosphatase. Standard staining procedures were used [20].

Electron microscopy

Small fragments of soleus and EDL muscles were fixed by immersion in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M PBS buffer (pH 7.4) for 48 h at 4 °C. Tissues were postfixed in 1% osmium tetroxide for 1 h at 4 °C, dehydrated through an acetone series and embedded in epoxy resin (Durcupan ACM, Fluka, Switzerland). Ultrathin sections were obtained with an LKB 8800 Ultratome III microtome (Sweden), placed on copper grids and stained with uranyl acetate and lead citrate. Observation was performed with a JEM 1400 high-resolution transmission electron microscope (JEOL, USA) installed at the Central Research Support Service (SCAI, University of Córdoba, Spain).

Histomorphometry

Histological sections were photographed with a Sony Exwaved HAD digital camera mounted on a Nikon Eclipse E1000 microscope (Nikon, Tokyo, Japan) and a Leica MC170 HD digital camera mounted on a Leica DM2000 microscope (Leica Microsystems, Germany). Morphometric analysis was performed using the Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Bethesda, MA, USA) image analysis program.

Five random fields at 40 \times were selected in each cross-section, covering a total area of 263.200 μ m²/muscle. *Ragged-blue* and *ragged-red* fibers were quantified on sections stained with SDH or modified Gomori trichrome, respectively. ATPase pH 9.6 was used to distinguish light-staining type 1 fibers from dark-staining type 2

fibers; intermediate fibers were identified as those displaying intermediate staining. This technique was used for fiber typing and to measure the cross-sectional area (μm^2) and minimum diameter (μm) of each fiber, these being standard measurements to quantify the degree of change in fiber size [20].

Biochemistry

Tissue levels of various oxidative damage and antioxidant-system markers were quantified in skeletal muscle homogenized in buffer Tris–ClH 20 mM, at pH 7.4.

Carbonylated proteins: Protein carbonylation was used as an indicator of protein oxidative stress. Carbonyl content was measured following Levine et al. [21], using a Shimadzu spectrophotometer (UV-1603; Kyoto, Japan) at a wavelength of 360 nm.

Lipid peroxidation products and glutathione systems: Levels of lipid peroxidation products, reduced glutathione (GSH) and the GSH/oxidized glutathione (GSSG) ratio were measured using the Bioxytech LPO-586, GSH-400 and GSH-412 kits, respectively (Oxis International, Portland, OR, USA). Measurements were made using a UV-1603 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan).

Alamar blue assay: This is a redox indicator that exhibits both fluorescent and colorimetric change in response to metabolic activity. This method may be used to examine mitochondrial function in tissues. Measurement of Alamar blue in skeletal muscle tissue preparations was performed using methods adapted from synapse studies [22,23].

Protein estimation: Protein levels were measured by the Bradford method, using a B6916 assay kit supplied by Sigma–Aldrich Co., Ltd (St. Louis, MO, USA).

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard deviation (SD). For statistical analysis of histomorphometric parameters, a one-way ANOVA was followed by the Newman–Keuls test to detect inter-group differences. The Holm Sidak test was performed for normal data; for non-normal data an ANOVA on ranks was performed, followed by Dunn's test. Statistical analysis of histomorphometric variables was carried out using the Sigma Stat 3.1 software package (Systat Software Inc). Analysis of biochemical parameters, weight and score were performed using the SPSS 17.7® statistical software package. To evaluate variations in data, a one-way ANOVA was used. The level of statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Clinical signs, body weight, muscle weight

Control and sham group animals showed no clinical signs of disease. There were also no significant differences in weight gain in these two groups (Fig. 1). While MOG-treated animals displayed a non-significant trend toward lower body weight both 14 days after treatment (OG and RG) (Fig. 1a) and 35 days post-induction (Fig. 1b), RG animals exhibited no change in weight gain from day 14 to 35 days post-induction (Fig. 1c). Only RG animals displayed muscle weight loss (Table 1).

Both OG and RG rats showed clinical signs 14 days post-induction (Table 2). On the day of sacrifice OG animals scored 2.20 ± 0.45 , while RG presented a score of 3.75 ± 1 . Clinical scores indicate that RG rats experienced a first relapse with a maximum mean score of 3.5 ± 0.6 ; this was followed by a remission phase from day 23 post-induction and finally a second relapse from day 30 (Fig. 2).

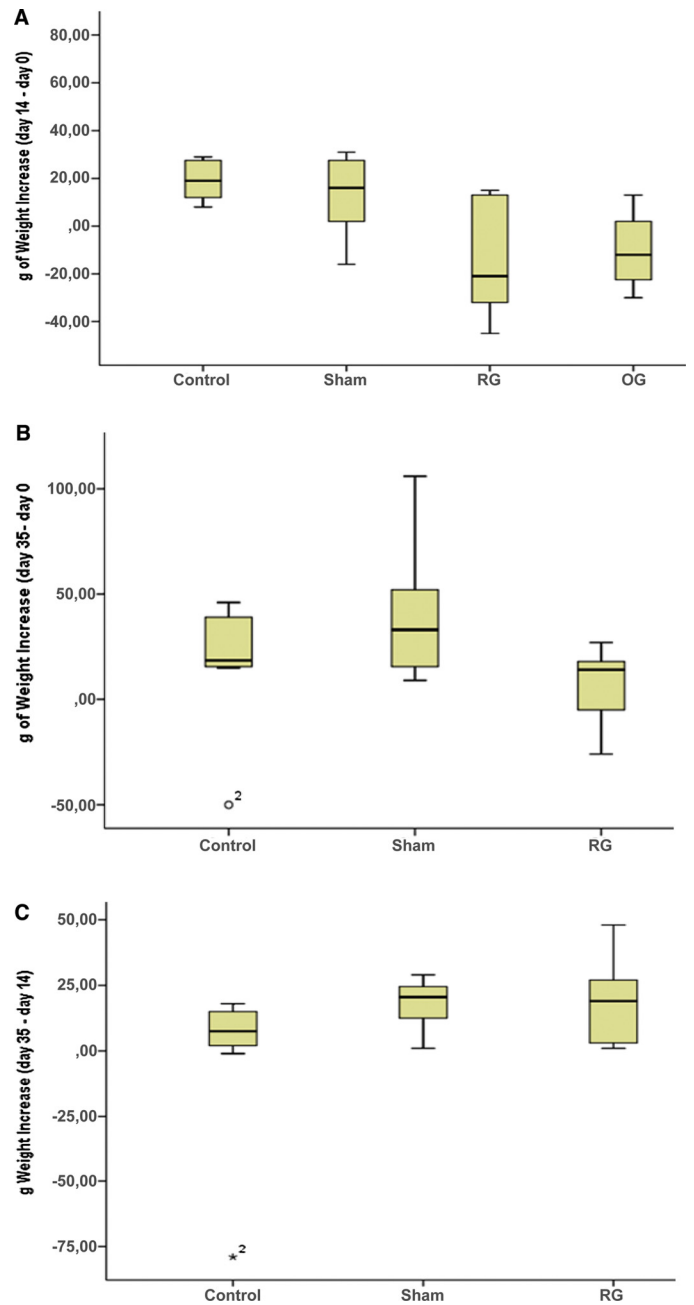


Fig. 1. Body weight increases in different groups. Horizontal line represents medians (geometric means), boxes indicate the 25th and 75th percentiles and vertical lines indicate minimum and maximum values. One-way ANOVA was used for statistical analysis. OG: onset group, RG: relapse group.

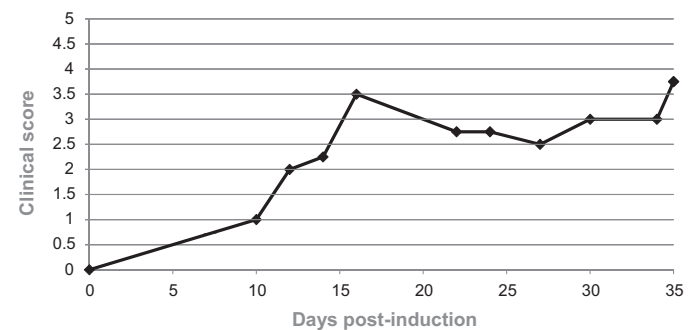


Fig. 2. Clinical scores over the course of the disease in RG rats. In a 35-day follow-up, two clinical relapses were observed in the RG group.

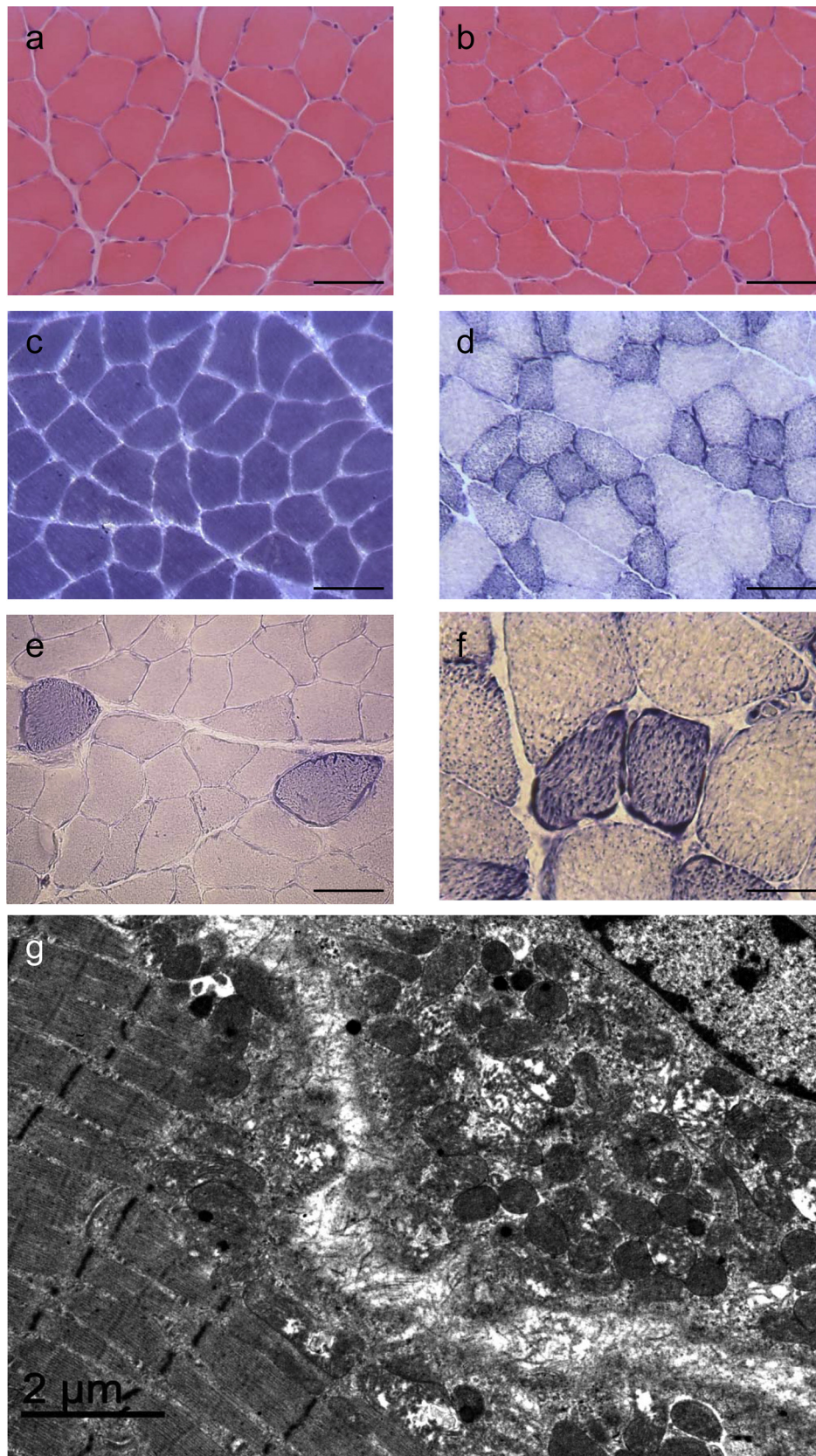


Fig. 3. Microscopic changes in the onset group (a), (b), (e)–(g) and control group (c) and (d). Muscle fiber cross-sections stained with H–E: soleus (a) and EDL (b) muscles showing normal appearance. Histochemical staining with SDH in normal soleus muscle (c) and NADH-tr in normal EDL muscle (d). Two *ragged-blue* fibers stained with SDH in soleus muscle (e) and with NADH-tr in EDL muscle (f); note in (e) the complete loss of SDH activity in surrounding fibers. (f) Electron micrograph of the periphery of two muscle fibers showing clumped mitochondria displaying degenerative changes. Scale bars: 50 μm (a)–(e) and 25 μm (e).

Table 1
Muscle weight.

	Control	Sham	OG	RG
Soleus	0.110 ± 0.008	0.103 ± 0.005	0.100 ± 0.011	0.065 ± 0.024 ^a
EDL	0.136 ± 0.010	0.129 ± 0.006	0.126 ± 0.005	0.082 ± 0.014 ^{a,b,c}

Values are mean ± SD.

^a Significant differences $p < 0.05$ vs control.^b Significant differences $p < 0.05$ vs sham.^c Significant differences $p < 0.05$ vs OG.**Table 2**
Clinical score.

	Control	Sham	OG	RG
Day 14 p.i.	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.20 ± 0.45	2.25 ± 0.9
Day 35 p.i.	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	–	3.75 ± 1

p.i.: post-induction.

Table 3
Percentage of fiber types.

	Control	Sham	OG	RG
Soleus				
Type 1	74.53 ± 9.22	72.35 ± 5.68	74.43 ± 5.41	45.69 ± 9.05 ^{d,e,f}
Intermediate	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.17 ± 2.98	20.64 ± 6.45 ^{a,b,c}
Type 2	25.47 ± 9.22	27.14 ± 5.66	23.30 ± 4.65	33.42 ± 6.45 ^{d,f}
EDL				
Type 1	5.86 ± 2.24	6.05 ± 2.24	6.22 ± 0.69	7.52 ± 3.02
Type 2a	65.48 ± 5.56	65.46 ± 3.75	62.13 ± 2.49	29.70 ± 7.83 ^{a,b,c}
Type 2b	29.51 ± 6.76	28.54 ± 4.48	31.35 ± 2.92	63.22 ± 8.89 ^{a,b,c}

Values are mean ± SD.

^a Significant differences $p < 0.05$ vs control.^b Significant differences $p < 0.05$ vs sham.^c Significant differences $p < 0.05$ vs OG.^d Significant differences $p < 0.01$ vs control.^e Significant differences $p < 0.01$ vs sham.^f Significant differences $p < 0.01$ vs OG.

Microscopic findings

Control and sham groups: No abnormalities were detected in the soleus and EDL muscles of either group using H–E and modified Gomori trichrome stains. NADH-tr and SDH staining showed that the intermyofibrillar network was preserved (Fig. 3c and d). There was no increase in acid phosphatase activity. Using ATPase pH 9.6 staining, no abnormalities or changes in muscle fiber size were detected, and in both soleus and EDL muscles a similar percentage of fiber types was observed in control and sham groups (Table 3). No ultrastructural abnormalities were detected in either group.

Onset group: No abnormalities were observed using H–E staining (Fig. 3a and b), except for occasional muscle fibers with a granular appearance in both soleus and EDL muscles. These fibers were disseminated and were identified as *ragged-red* or *ragged-blue* fibers, since they contained subsarcolemmal material and intrasarcoplasmic grainy material which stained red or blue with modified Gomori trichrome or SDH, respectively (Fig. 3e); NADH-tr staining also revealed peripheral areas of high oxidative activity (Fig. 3f). *Ragged-blue* fibers contrasted sharply with the low SDH staining observed in surrounding muscle fibers (Fig. 3e). A similar percentage of *ragged-red* fibers was recorded in both muscles ($3.11 \pm 1.24\%$ of soleus muscle fibers and $2.89 \pm 2.04\%$ of EDL muscle fibers). Electron microscopy disclosed the coexistence of normal and degenerative mitochondria, some exhibiting thickening of mitochondrial cristae. Mitochondria were observed in peripheral clumps, and although no paracrystalline inclusions were found, most exhibited degenerative changes (Fig. 3g).

Acid phosphatase staining was negative, and no cytoarchitectural changes were visible with NADH-tr and ATPase staining

(Fig. 4a and b). Although the myofibrillar component remained intact throughout the fiber, there was evidence of disorganization of peripheral myofibrils, and nemaline bodies were observed together with small vacuoles containing mitochondria and other debris identified as residual bodies, altogether suggestive of initial autophagocytosis (Fig. 4c). Satellite cells located between fiber plasma and basement membranes showed moderate evidence of activation (Fig. 4d and e). Some satellite cells were fusing with muscle fibers (Fig. 4e).

Morphometric analysis revealed no changes in mean minimum diameter and mean cross-sectional area of muscle fibers (Table 4). Fiber-type composition was not altered in either soleus or EDL muscles (Fig. 4a and b), although some intermediate fibers were observed in soleus muscle (Table 3).

Relapsing group: H–E staining revealed angulated atrophic muscle fibers in the soleus muscle, whereas atrophic fibers in the EDL muscle showed mainly rounded contours (Fig. 5a and b). In this group, *ragged-red* fibers were also visible with modified Gomori trichrome in both muscles (Fig. 5c), though their disorganized cytoarchitectural pattern made recognition difficult with oxidative techniques. Ultrastructurally, these fibers contained mitochondrial masses displaying subsarcolemmic degenerative changes (Fig. 5d); intermyofibrillar mitochondria were also affected (Fig. 5e). These degenerative changes mainly consisted in swollen mitochondria, with vacuolization, cristae dissolution and myelin bodies (Fig. 5e). Under light microscopy, both muscles exhibited non-necrotic fibers showing focal evidence of acid phosphatase activity (Fig. 5f), identified by electron microscopy as autophagic vacuoles containing degenerated mitochondria and membranous spirals (Fig. 5g).

NADH-tr staining revealed a considerably altered pattern of oxidative activity, with a spectrum of cytoarchitectural changes (moth-eaten, target, targetoid and central spot) in soleus muscle (Fig. 6a–c), while the pattern in EDL muscle consisted primarily in internal disorganization of the intermyofibrillar pattern, clearly evident in single or multiple small foci of decreased oxidative enzyme activity; these fibers had a core/multicore, lobulated appearance (Fig. 6d and e). These changes in cell architecture appeared interspersed in the same sections and their frequency varied even among muscles from the same animal (Fig. 6f–i).

ATPase pH 9.6 stained type 1 fibers light and type 2 fibers dark in normal soleus and EDL muscles (Fig. 7a–c). In soleus muscle, but not in EDL muscle, this technique revealed fibers staining intermediate in color between type 1 and type 2 (Fig. 7b–d); in soleus muscle these fibers also showed core-type cytoarchitectural changes indicative of absence of ATPase activity (Fig. 7d). Morphometric analysis revealed major atrophy of type 1 and 2 fibers in both muscles; intermediate fiber sizes lay within those of type 1 and type 2 fibers (Table 4). Ultrastructurally, muscle fibers displayed areas of focal myofibrillar degeneration, with streaming and disintegration of the Z disk (Fig. 7e).

Most intramuscular nerves exhibited no ultrastructural alterations, although degenerative changes were occasionally observed in myelin sheaths consisting in dissolution of internal and external lamellae and myelin degeneration (Fig. 7f).

Biochemical changes

Control and sham group: In order to establish more clearly the mechanistic-molecular processes underlying muscle alterations associated with the MOG-induced EAE model, various oxidative damage biomarkers were analyzed. Normal levels for oxidative stress and mitochondrial activity markers were established in the light of data obtained from control muscles (Tables 5 and 6).

Data for the sham group revealed increased lipid oxidation in soleus muscles (Table 6), together with a reduction in glutathione ratio which was associated with increased GSH content (Table 5).

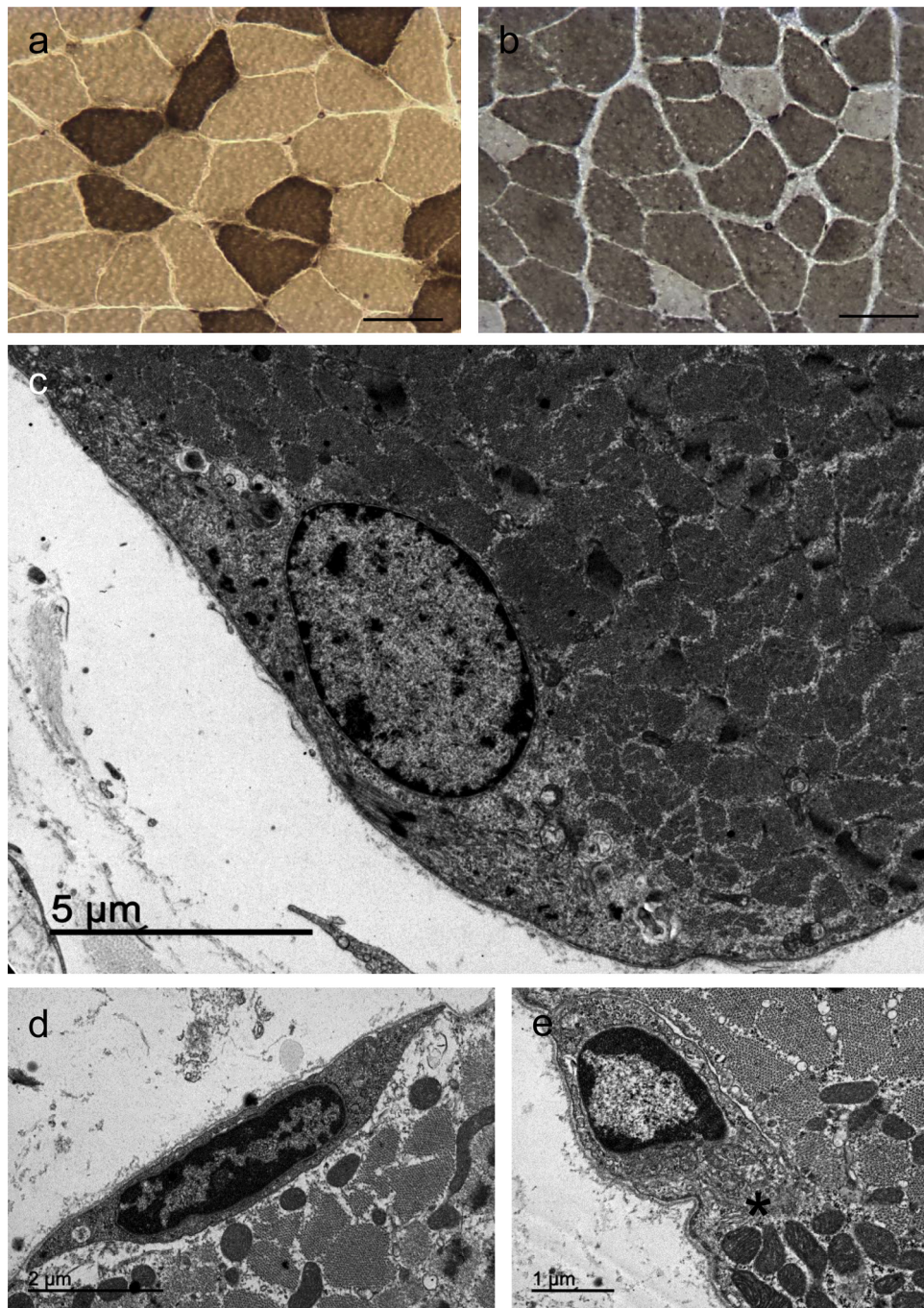


Fig. 4. Microscopic changes in the onset group (a)–(e). Cross-sections stained with myosin ATPase at pH 9.6; white-stained fibers (type 1) and dark-stained fibers (type 2) in soleus (a) and EDL (b) muscles. (c) Electron micrograph of the periphery of a muscle fiber showing occasional rods and degenerate mitochondria. (d) and (e) Electron micrograph of two activated satellite cells; asterisk (*) in (e) indicates the area of fusion with the muscle fiber. Scale bars: 40 μm (a) and (b).

EDL muscle not exhibiting any oxidative damage or GSH content changes displayed an increased GSH/GSSG ratio (Tables 5 and 6).

Onset group: No significant change was observed in levels of carbonylated proteins, used here as a biomarker of oxidative damage, in either of the muscles examined at disease onset. However, a significant reduction in GSH content in EDL muscle was accompanied by a glutathione redox ratio that tended to be smaller than that of control and sham groups, though the difference was not statistically significant (Table 5). A significant reduction in the glutathione balance was observed for the soleus muscle (Table 5).

Relapsing group: Analysis of oxidative damage markers over a longer period of EAE development disclosed increased oxidative

damage characterized by an increase in lipoperoxidation product (Table 6) and carbonylated protein levels (Table 5) in both muscles, although the increase in carbonylated proteins in the soleus muscle was not statistically significant (Table 5).

In order to obtain greater knowledge of skeletal muscle alterations, changes involving mitochondria in the longer-term group (RG) were charted with respect to the control and sham groups. For this purpose, mitochondrial function was assessed using the Alamar blue assay. This procedure, employed to evaluate cell viability (proliferation and cytotoxicity), is based on the capacity of the mitochondrial enzyme to reduce resazurin to resofurin, which serves as an indicator of mitochondrial function. Results indicated a highly

Table 4

Cross-sectional area and minimum diameter.

	Control	Sham	OG	RG
Cross-sectional area (μm^2)				
Soleus				
Type 1	1829.30 \pm 500.98	1707.98 \pm 297.05	1764.09 \pm 356.23	1325.23 \pm 291.02 ^{a,b,c}
Intermediate	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	1643.96 \pm 228.17 ^{a,b}	1125.02 \pm 294.10 ^{a,b,c}
Type 2	1728.17 \pm 284.04	1534.50 \pm 240.03	1550.57 \pm 288.13	1032.68 \pm 236.21 ^{a,b,c}
EDL				
Type 1	964.46 \pm 160.96	941.47 \pm 162.50	862.98 \pm 235.37	470.96 \pm 98.50 ^{a,b,c}
Type 2a	1175.61 \pm 278.27	1106.86 \pm 249.45	1247.33 \pm 180.07	605.12 \pm 229.49 ^{a,b,c}
Type 2b	2200.23 \pm 355.20	2065.75 \pm 312.09	2330.20 \pm 722.85	1462.07 \pm 302.08 ^{a,b,c}
Minimum diameter (μm)				
Soleus				
Type 1	36.64 \pm 6.35	35.72 \pm 4.19	36.90 \pm 5.04	30.84 \pm 5.39 ^{a,b,c}
Intermediate	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	33.49 \pm 3.86 ^{a,b}	27.69 \pm 4.17 ^{a,b,c}
Type 2	33.77 \pm 6.04	33.00 \pm 5.40	33.24 \pm 5.46	27.17 \pm 4.59 ^{d,e,f}
EDL				
Type 1	26.88 \pm 3.23	26.22 \pm 3.58	25.74 \pm 4.23	17.94 \pm 3.07 ^{d,e,f}
Type 2a	31.51 \pm 4.21	30.52 \pm 3.88	30.38 \pm 3.75	20.63 \pm 4.91 ^{d,e,f}
Type 2b	43.13 \pm 4.72	41.95 \pm 4.36	41.64 \pm 7.77	32.11 \pm 5.00 ^{a,b,c}

Values are mean \pm SD.^a Significant differences $p < 0.05$ vs control.^b Significant differences $p < 0.05$ vs sham.^c Significant differences $p < 0.05$ vs OG.^d Significant differences $p < 0.01$ vs control.^e Significant differences $p < 0.01$ vs sham.^f Significant differences $p < 0.01$ vs OG.

significant decrease in both muscles in the RG with respect to control and sham animals (Table 6). In addition, mitochondrial activity declined by around 50% in the sham group in comparison to control group; this decline, however, was not statistically significant (Table 6).

Discussion

The present study analyzed microscopic changes, clinical score and oxidative damage biomarkers in rat skeletal muscle in an EAE model. The results revealed that skeletal muscles are affected both in the acute phase (onset), when the first disease symptoms appear (OG), and in the middle-to-long term at the start of the second relapse phase (RG). However, the nature of the changes differed between these two time-points: immediately after the appearance of clinical signs, skeletal muscle changes were almost entirely mitochondrial, while muscle lesions at the start of the second relapse pointed to a neurogenic lesion. One striking finding was that although both soleus and EDL muscles were affected, there were differences in the microscopic changes observed; this may be attributable to different pathological reactions in different fiber types [16].

A few authors have reported mitochondrial dysfunction in association with central nervous system axonal degeneration both in EAE [24] and in MS [25,26]; to our knowledge, however, this is

the first time that changes in muscle mitochondria have been recorded in an experimental EAE model. The major finding under light microscopy was the presence of *ragged-red* or *ragged-blue* fibers in both soleus and EDL muscles in the acute phase group (OG). These muscle fibers are the histological consequence of mitochondrial dysfunction; although they may be prompted by a wide spectrum of injuries, they are typically found in mitochondrial myopathies [27]. *Ragged-red* fibers have been reported in muscle biopsies from MS patients with associated mitochondrial disorders [28,29]; although the findings recorded by Campbell et al. [4] do not support the existence of a mitochondrial genetic abnormality as the underlying cause.

Earlier studies of muscle histology in EAE models [8,9] have found no evidence of mitochondrial disorder. However, the present results suggest clear mitochondrial damage. Although mitochondrial abnormalities were virtually the only clearly apparent histological change in the OG, in the RG degenerative changes in muscle mitochondria were more evident; attention is particularly drawn to the presence of autophagic vacuoles with acid-phosphatase-positive mitochondrial debris under light microscopy. This latter finding might indicate a cell protection mechanism aimed at eliminating degenerate mitochondria [30]; indeed, recent research has highlighted the existence of selective mechanism of mitochondria degradation by autophagy, termed mitophagy [31]. This mechanism would suggest that EAE impairs

Table 5

Values of carbonylated protein (CP), reduced glutathione (GSH) and GSH/oxidized glutathione ratio (GSH/GSSG) in skeletal muscle.

	CP (nMol/mg protein)		GSH (nMol/mg protein \times 10)		GSH/GSSG	
	Soleus	EDL	Soleus	EDL	Soleus	EDL
Control	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.003 \pm 0.000	0.004 \pm 0.000	0.10 \pm 0.00	0.035 \pm 0.010
Sham	0.03 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.007 \pm 0.000 ^b	0.004 \pm 0.000	0.07 \pm 0.05 ^c	0.042 \pm 0.020 ^b
OG	0.02 \pm 0.01	0.03 \pm 0.02	0.002 \pm 0.000	0.001 \pm 0.000 ^c	0.05 \pm 0.00 ^c	0.026 \pm 0.005
RG	0.04 \pm 0.01	0.03 \pm 0.02 ^c	0.001 \pm 0.000 ^{b,d}	0.001 \pm 0.000 ^b	0.02 \pm 0.00 ^{a,d}	0.010 \pm 0.005 ^{a,e}

Values are mean \pm SD.^a Significant differences $p < 0.001$ vs control.^b Significant differences $p < 0.01$ vs control.^c Significant differences $p < 0.05$ vs control.^d Significant differences $p < 0.001$ vs sham.^e Significant differences $p < 0.05$ vs sham.

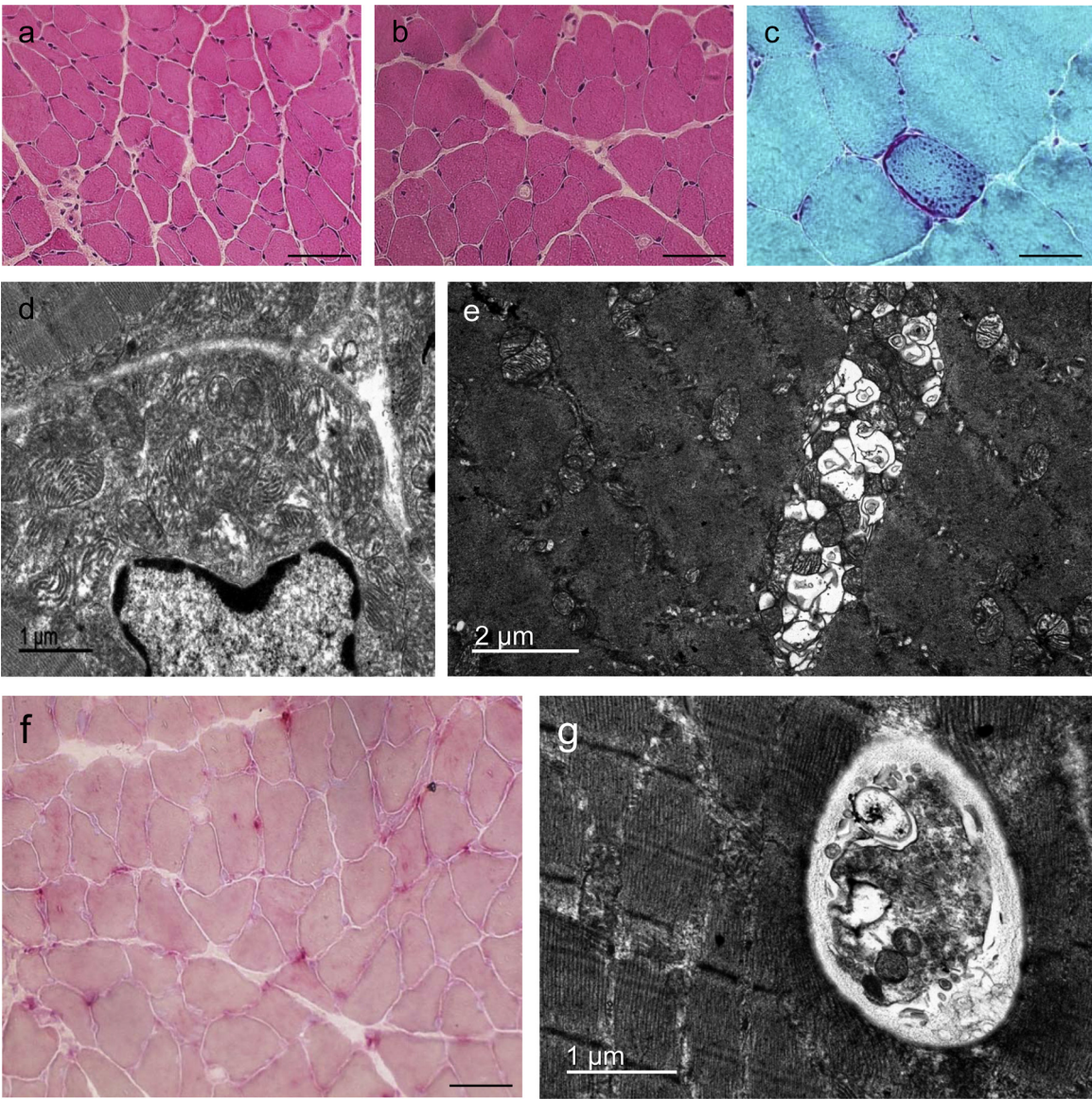


Fig. 5. Microscopic changes in the relapse group (a)–(g). Muscle fiber cross-sections stained with H–E: soleus (a) and EDL (b) muscles showing variability in muscle fiber size with numerous angulated atrophic fibers between others with rounded contours. (c) *Ragged-red* fibers in EDL muscle stained with modified Gomori trichrome. Electron micrographs showing mitochondrial clumping in subsarcolemmic (d) and intermyofibrillar (e) locations; in (d) the mitochondria contain plate-like cristae and some display a swollen matrix; in (e) some mitochondria are degenerate and contain myeloid structures. (f) Diffuse acid phosphatase activity in all soleus muscle fibers; some displaying high granular activity. (g) Electron micrograph showing an autophagic vacuole containing degenerating organelles enclosed in a membrane-bound space. Scale bars: 50 μ m (a), (b) and (f).

mitochondrial function, a view supported here by biochemical evidence of reduced mitochondrial viability. If confirmed in humans, this mechanism may account for the reduced oxidative capacity of skeletal muscle in MS [3,32].

Table 6
Values of Alamar blue (AB) fluorescence and lipid peroxidation products (LPO) in skeletal muscle.

	AB fluorescence (arbitrary units)		LPO (nMol/mg protein)	
	Soleus	EDL	Soleus	EDL
Control	244.9 \pm 38	252.3 \pm 17	0.10 \pm 0.04	0.08 \pm 0.04
Sham	127.9 \pm 92	113.9 \pm 70	0.13 \pm 0.11 ^c	0.07 \pm 0.03
RG	26.0 \pm 0.9 ^a	25.9 \pm 0.7 ^a	0.12 \pm 0.05 ^b	0.10 \pm 0.02 ^c

Values are mean \pm SD.

^a Significant differences $p < 0.001$ vs control.

^b Significant differences $p < 0.01$ vs control.

^c Significant differences $p < 0.05$ vs control.

It may be hypothesized that the mitochondrial changes observed in OG rats were an early expression of the severe neurogenic lesion later observed in RG rats. It is well known that during the first week post-denervation mitochondria form clusters, present degenerative changes and appear inside autophagic vacuoles [33,34]. Attention is drawn to the fact that mitochondrial disorder in the present study was expressed in *ragged-red* fibers not observed in neurogenic processes of skeletal muscle. Moreover, the present findings are in agreement with the view that mitochondrial changes are the first sign of ultrastructural damage to the central nervous system in murine EAE models [24,35].

As also reported by Qi et al. [24], the present findings suggest that mitochondrial damage in the EAE model could be linked to oxidative damage. Biochemical testing indicated increased oxidative stress together with a lowering of defense systems that was more marked in RG rats and similar in both muscles. This analogous response was unexpected, in that the characteristics of the

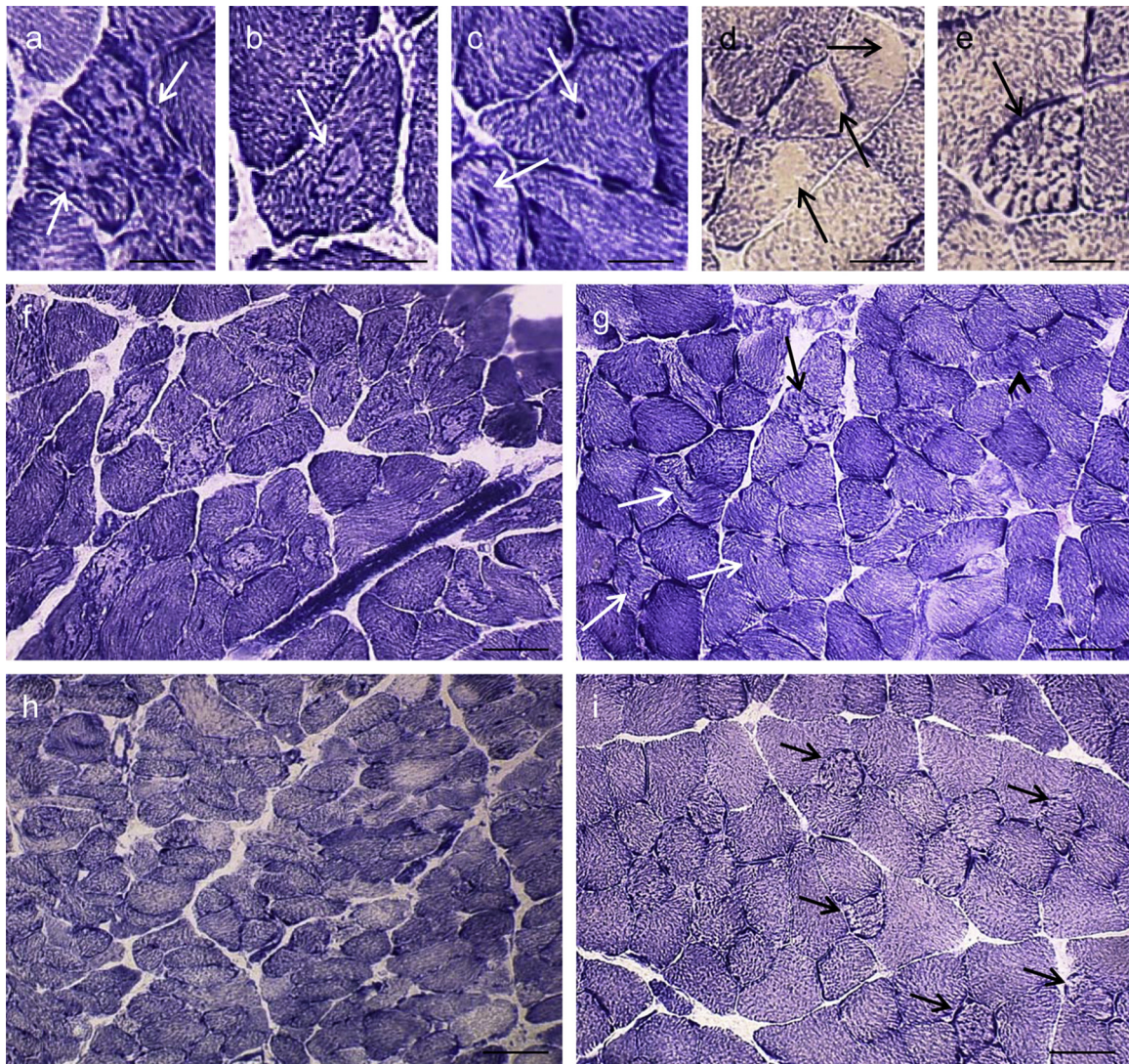


Fig. 6. Microscopic changes in relapse group (a)–(i). Cytoarchitectural patterns revealed by NADH-tr staining in several fibers of the soleus (a)–(c) and EDL (d)–(e) muscles: moth-eaten (a), target (b), central spot (c), core (d), lobulated (e). Transverse sections of soleus (f)–(g) and EDL (h) and (i) muscles from the same rat, stained with NADH-tr. In soleus muscle, numerous target fibers were visible (f) with a dark rim around a central pale area of oxidative activity and, in the contralateral muscle (g), occasional fibers showing target (arrowhead), moth-eaten (black arrow), and central spot lesions (white arrows). In EDL muscle severe atrophy was evident, but no clear abnormalities in the oxidative activity pattern could be identified with NADH-tr staining (h). The abnormal oxidative enzyme reaction pattern leads to a lobulated appearance in several muscle fibers (arrows) (i). Scale bars: 100 μ m (a)–(e) and 50 μ m (e).

different fiber types tend to determine their response to oxidative stress: while type 1 fibers display high antioxidant capacity, type 2 fibers exhibit low oxidative ability; moreover, though type 2 fibers may generate fewer oxygen reactive species during normal metabolism, they appear to be more sensitive to increases in oxidative stress because their antioxidant defensive systems are less well developed [36]. Here, however, antioxidant mechanisms in soleus muscle, which has a higher number of type 1 fibers, showed greater depletion than those of EDL muscle at the onset of symptoms. At the start of the second relapse, by contrast, depletion was similar and more marked in both muscles, indicating similar degree of mid- to long-term susceptibility, and a possible increase in oxygen reactive species production, evident in greater oxidative damage at a more advanced stage in the disease. Indeed, oxygen reactive species have been identified as one of the major driving forces behind autophagy in skeletal denervated muscle [37]. The present findings confirm the link between mitochondrial damage, oxidative stress and neurogenic damage.

Soleus and EDL muscle displayed a similar degree of atrophy, exhibiting 40% and 45% reduction, respectively, at the second relapse. Strikingly, no atrophy was observed in OG rats, although other studies of EAE [8,9] report a 22–53% reduction in muscle fiber size; this difference in findings may be due to the animals used, the muscles examined and/or the techniques applied. Muscle atrophy in MS is thought to be caused by disuse, CNS motor control deficit and metabolic disorders [3,7], in the EAE model, atrophy is regarded as the result of sudden muscle inactivity due to neurological damage [8]. In the present study, the neurogenic nature of the atrophy was evident in the presence of angular atrophic fibers, cytoarchitectural core–target–targetoid type changes and intermediate fibers. The absence of these findings in other experimental studies may reflect their focus on disease onset, and the failure to examine skeletal muscle at a more advanced stage [8,9]. Moreover, the changes observed in the OG already suggested the beginnings of a neurogenic lesion: the incipient myofibrillar structural disorganization – usually beginning in the muscle fiber periphery

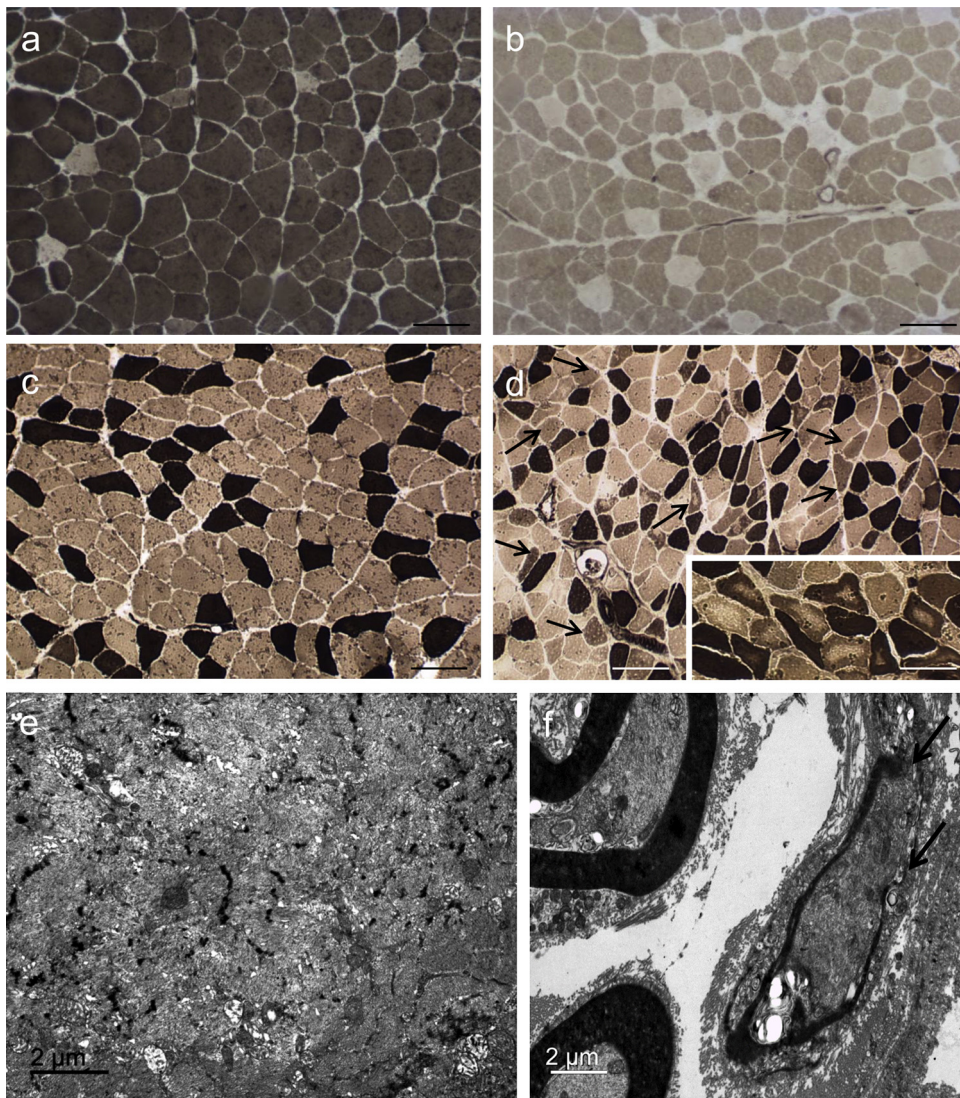


Fig. 7. Microscopic changes in control (a) and (c) and relapse groups (b)–(f). On cross-sections stained with ATPase at pH 9.6, two muscle fiber types could be distinguished in normal EDL muscle (a); there were no changes in muscle fiber type composition or cytoarchitectural abnormalities (b). With the same stain, intermediate muscle fibers (arrows) are visible in relapsing soleus muscle (d) but not in normal soleus muscle (c); (d) *insert*: core areas are present in all muscle fiber types. (e) This electron micrograph shows the center of a target formation with loss of myofibrillar structure. (f) Electron micrograph of intramuscular nerve fascicle in soleus muscle; note the presence of demyelination in one of the nerve fibers (arrows). Scale bars: 100 μm (a)–(d) and 50 μm (d: insert).

[38] – and the existence of satellite activated cells [39,40], are commonly reported changes in the first days post-denervation.

Even where both muscles displayed atrophy, the soleus muscle exhibited a variety of multiple lesions (moth-eaten, core, target, targetoid and central spot), whereas the EDL muscle exhibited only core/multicore changes and lobulated fibers using oxidative stains. Target fibers are usually type 1 fibers [16], which would account for their absence in EDL muscle. It should be noted that these fibers have not hitherto been reported in EAE models, and have only been identified in one MS patient [41]. Nevertheless, the variety of cytoarchitectural changes observed here in soleus muscle could be seen as different morphological patterns of the same process: the skeletal muscle fiber response to innervation loss and its attempted recovery. It has been suggested that this morphological spectrum could represent different phases of a process evolving toward fiber normality or to a morphological sequel that is a central area of oxidative activity (central spot) [42]. Given that target fibers cannot be produced experimentally [16], the EAE model used here may prove valuable for studying the pathogenesis of these lesions. At the same time, attention is drawn to the different degrees of

lesion observed between muscles from the same animal, a finding which in principle would reflect the heterogeneous clinical manifestation of MS depending on the location of the central nervous system lesion [43].

As other authors have noted, in neurogenic lesions both target fibers and moth-eaten fibers may be suggestive of reinnervation processes [16,38,44]. That being so, their presence in RG rats would complement evidence of a clinical improvement just before relapse. In this respect, peripheral nerve remyelination phenomena have been reported 3 weeks after the onset of EAE symptoms [45]. This may also account for the presence of intermediate fibers in soleus muscle stained for ATPase pH 9.6, these fibers being linked to denervation and reinnervation in human muscle [44]. Intermediate fibers are also frequently found in muscles undergoing transformation as a result of decreased neuromuscular activity [46]. Their presence in RG rats, together with the reduction of type 1 fibers in soleus muscle, points to a change in fiber-type composition. The change toward type 2 fibers in denervated muscles is well documented [47], and the transformation of type 1 into type 2 fibers has been reported in MS patients [3,7].

Although the peripheral nervous system was not examined here, other studies of EAE models report demyelination in peripheral nerves [48,49]. Most intramuscular nerves here showed no structural changes, a finding also noted for a number of rabbit and mouse EAE models [48,49]. This suggests that the severity of the changes observed here in both soleus and EDL muscles must be linked to injuries at a higher level of the nervous system, and may be attributable to the distress or loss of spinal motoneurons reported in some EAE models [10,50].

Taken in conjunction, the above findings highlighted the involvement of a neurogenic phenomenon from an early stage of the disease. These results are in line with recent reports regarding the joint existence of inflammatory and neurodegenerative processes from the onset of MS, a situation running counter to the conventional establishment of two independent stages: an initial inflammatory stage and a second stage characterized by neurodegenerative processes [43,51].

In conclusion, skeletal muscle was found to be severely affected in the EAE model used here. Microscopic findings suggest that two patterns can be distinguished at disease onset: a first phase characterized by muscle mitochondrial alterations and a second phase dominated by a histological muscle pattern of clearly neurogenic origin. These results indirectly provide new evidence regarding the development of nervous system lesions in this EAE model for MS, and at the same time serve as a standard for evaluating the efficacy of a range of therapies using skeletal muscle as target organ, though caution should always be exercised when comparing EAE with MS [13].

Funding

I. Ruz-Caracuel has received a *Beca de Colaboración* grant from the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport.

Acknowledgments

The authors are grateful to Mr. Manuel LaTorre, Ms. Ana Isabel Giraldo and Mr. Antonio Agüera for all technical support and assistance.

References

- [1] R. Bakshi, Fatigue associated with multiple sclerosis: diagnosis, impact and management, *Mult. Scler.* 9 (2003) 219–227.
- [2] M.A. Rizzo, O.C. Hadjimichael, J. Preiningerova, T.L. Vollmer, Prevalence and treatment of spasticity reported by multiple sclerosis patients, *Mult. Scler.* 10 (2004) 589–595.
- [3] J.A. Kent-Braun, A.V. Ng, M. Castro, M.W. Weiner, D. Gelinas, G.A. Dudley, R.G. Miller, Strength, skeletal muscle composition, and enzyme activity in multiple sclerosis, *J. Appl. Physiol.* 83 (1997) 1998–2004.
- [4] G.R. Campbell, A.K. Reeve, I. Ziabreva, R. Reynolds, D.M. Turnbull, D.J. Mahad, No excess of mitochondrial DNA deletions within muscle in progressive multiple sclerosis, *Mult. Scler.* 19 (2013) 1858–1866.
- [5] D.J.P. Garner, J.J. Widrick, Cross-bridge mechanisms of muscle weakness in multiple sclerosis, *Muscle Nerve* 27 (2003) 456–464.
- [6] H.H. Kumleh, G.H. Riaz, M. Houshmand, M.H. Sanati, K. Gharagozli, M. Shafa, Complex I deficiency in Persian multiple sclerosis patients, *J. Neurol. Sci.* 243 (2006) 65–69.
- [7] C.C. Carroll, P.M. Gallagher, M.E. Seidle, S.W. Trappe, Skeletal muscle characteristics of people with multiple sclerosis, *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 86 (2005) 224–229.
- [8] A. De Haan, M.R. van der Vliet, J.J.A. Hendriks, D.A.M. Heijnen, C.D. Dijkstra, Changes in characteristics of rat skeletal muscle after experimental allergic encephalomyelitis, *Muscle Nerve* 29 (2004) 369–375.
- [9] S. Park, K. Nozaki, M.K. Guyton, J.A. Smith, S.K. Ray, N.L. Banik, Calpain inhibition attenuated morphological and molecular changes in skeletal muscle of experimental allergic encephalomyelitis rats, *J. Neurosci. Res.* 90 (2012) 2134–2145.
- [10] J. Vogt, F. Paul, O. Aktas, K. Müller-Wielsch, J. Dörr, S. Dörr, B.S. Bharathi, R. Glumm, C. Schmitz, H. Steinbusch, C.S. Raine, M. Tsokos, R. Nitsch, F. Zipp, Lower motor neuron loss in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis, *Ann. Neurol.* 66 (2009) 310–322.
- [11] M.S. Recks, E.R. Stormanns, J. Bader, S. Arnhold, K. Addicks, S. Kuerten, Early axonal damage and progressive myelin pathology define the kinetics of CNS histopathology in a mouse model of multiple sclerosis, *Clin. Immunol.* 149 (2013) 32–45.
- [12] N. Baumann, D. Pham-Dinh, Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system, *Physiol. Rev.* 81 (2001) 871–927.
- [13] M.A. Friese, K. Montalban, N. Wilcox, J.L. Bell, R. Martin, L. Fugger, The value of animal models for drug development in multiple sclerosis, *Brain* 129 (2006) 1940–1952.
- [14] M.R. Emerson, R.J. Gallagher, J.G. Marquis, S.M. LeVine, Enhancing the ability of experimental autoimmune encephalomyelitis to serve as a more rigorous model of multiple sclerosis through refinement of the experimental design, *Comp. Med.* 59 (2009) 112–128.
- [15] B.G. Pérez-Nievas, B. García-Bueno, J.L. Madrigal, J.C. Leza, Chronic immobilisation stress ameliorates clinical score and neuroinflammation in a MOG-induced EAE in Dark Agouti rats: mechanisms implicated, *J. Neuroinflamm.* 7 (2010) 60.
- [16] S. Carpenter, K. Karpati, *Pathology of Skeletal Muscle*, Oxford University Press, New York, 2001.
- [17] E.I. Dedkov, A.B. Borisov, B.M. Carlson, Dynamics of postdenervation atrophy of young and old skeletal muscles: differential responses of fiber types and muscle types, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 58 (2003) 984–991.
- [18] R.B. Armstrong, R.O. Phelps, Muscle fiber type composition of the rat hindlimb, *Am. J. Anat.* 171 (1984) 259–272.
- [19] B.A. 't Hart, B. Gran, R. Weissert, EAE: imperfect but useful models of multiple sclerosis, *Trends Mol. Med.* 17 (2011) 119–125.
- [20] V. Dubowitz, C.A. Sewry, *Muscle Biopsy: A Practical Approach*, third ed., Saunders Elsevier, London, 2007.
- [21] R.L. Levine, D. Garland, C.N. Olivier, A. Amici, I. Climent, A.G. Lenz, B.W. Ahn, S. Shaltiel, E.T. Stadtman, Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 464–478.
- [22] P. Montilla, I. Túnez, M.C. Muñoz, M. Salcedo, M. Feijóo, J.R. Muñoz-Castañeda, I. Bujalance, Effect of glucocorticoids on 3-nitropropionic acid-induced oxidative stress in synaptosomes, *Eur. J. Pharmacol.* 488 (2004) 19–25.
- [23] J.E. Springer, R.D. Azbill, S.L. Carlson, A rapid and sensitive assay for measuring mitochondrial metabolic activity in isolated neural tissue, *Brain Res. Protoc.* 2 (1998) 259–263.
- [24] X. Qi, A.S. Lewin, L. Sun, W.W. Hauswirth, J. Guy, Mitochondrial protein nitration primes neurodegeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 31950–31962.
- [25] R. Dutta, J. McDonough, X. Yin, J. Peterson, A. Chang, T. Torres, T. Gudiz, W.B. Macklin, D.A. Lewis, R.J. Fox, R. Rudick, K. Mirnics, B.D. Trapp, Mitochondrial dysfunction as a cause of axonal degeneration in multiple sclerosis patients, *Ann. Neurol.* 59 (2006) 478–489.
- [26] D. Mahad, H. Lassmann, D. Turnbull, Mitochondria and disease progression in multiple sclerosis, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 34 (2008) 577–589.
- [27] Z. Riffai, S. Welle, C. Kamp, C.A. Thornton, Ragged red fibers in normal aging and inflammatory myopathy, *Ann. Neurol.* 37 (1995) 24–29.
- [28] L. Bet, M. Moggio, G.P. Comi, C. Mariani, A. Prella, N. Ceccarelli, A. Bordon, N. Bresolin, E. Scarpini, G. Scarlato, Multiple sclerosis and mitochondrial myopathy: an unusual combination of diseases, *J. Neurol.* 241 (1994) 511–516.
- [29] R.W. Taylor, P.F. Chinnery, M.J. Bates, M.J. Jackson, M.A. Johnson, R.M. Andrews, D.M. Turnbull, A novel mitochondrial DNA point mutation in the tRNA (Ile) gene: studies in a patient presenting with chronic progressive external ophthalmoplegia and multiple sclerosis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243 (1998) 47–51.
- [30] I. Kim, S. Rodriguez-Enriquez, J.J. Lemasters, Selective degradation of mitochondria by mitophagy, *Arch. Biochem. Biophys.* 462 (2007) 245–253.
- [31] J.J. Lemasters, Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging, *Rejuvenation Res.* 8 (2005) 3–5.
- [32] P. Mao, P.H. Reddy, Is multiple sclerosis a mitochondrial disease? *Biochim. Biophys. Acta* 1802 (2010) 66–79.
- [33] M.J. Cullen, M.G. Pluskal, Early changes in the ultrastructure of denervated rat skeletal muscle, *Exp. Neurol.* 56 (1997) 115–131.
- [34] B.R. Macintosh, P.F. Gardiner, A.J. McComas, *Skeletal Muscle: Form and Function*, Human Kinetics, Champaign, 2006.
- [35] I. Nikić, D. Merkel, C. Sorbara, M. Brinkoetter, M. Kreutzfeldt, F.M. Bareyre, W. Brück, D. Bishop, T. Misdeld, M. Kerschensteiner, A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis, *Nat. Med.* 17 (2011) 495–499.
- [36] T.A. Rando, Oxidative stress and the pathogenesis of muscular dystrophies, *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 81 (2006) S175–S186.
- [37] M.F. O'Leary, A. Vainshtein, H.N. Carter, Y. Zhang, D.A. Hood, Denervation-induced mitochondrial dysfunction and autophagy in skeletal muscle of apoptosis-deficient animals, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 303 (2012) C447–C454.
- [38] A.G. Engel, B.Q. Banker, Ultrastructural changes in diseased muscle, in: A.G. Engel, C. Franzini-Armstrong (Eds.), *Myology*, third ed., McGraw-Hill, New York, 2004, pp. 749–888.
- [39] A. Bornemann, F. Maier, R. Kuschel, Satellite cells as players and targets in normal and diseased muscle, *Neuropediatrics* 30 (1999) 167–175.
- [40] S.F. van der Meer, R.T. Jaspers, D.A. Jones, H. Degens, Time-course of changes in the myonuclear domain during denervation in young-adult and old rat gastrocnemius muscle, *Muscle Nerve* 43 (2011) 212–222.
- [41] J.E. Riggs, S.S. Schochet Jr., T.A. Kopitnik, L. Gutmann, Target fibers in multiple sclerosis: implications for pathogenesis, *Neurology* 36 (1986) 297–298.
- [42] S.M. Chou, Core-genic neuromyopathies, in: R.R. Heffner Jr. (Ed.), *Muscle Pathology*, Churchill Livingstone, New York, 1984, pp. 83–108.

- [43] M.A. Friese, B. Schattling, L. Fugger, Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis, *Nat. Rev. Neurol.* 10 (2014) 225–238.
- [44] J.L. Griffin, G.H. Pezehskpour, Myosin ATPase intermediate density fibers for diagnosis of reinnervation, *Muscle Nerve* 11 (1988) 915–921.
- [45] C.S. Raine, H. Wiśniewski, J. Prineas, An ultrastructural study of experimental demyelination and remyelination. II. Chronic experimental allergic encephalomyelitis in the peripheral nervous system, *Lab. Investig.* 21 (1969) 316–327.
- [46] R.J. Talmadge, Myosin heavy chain isoform expression following reduced neuromuscular activity: potential regulatory mechanisms, *Muscle Nerve* 23 (2000) 661–679.
- [47] K. Sakuma, A. Saitoh, S. Katsuta, Denervation-induced region-specific changes in fibre types in the soleus and plantaris muscles of rats, *Acta Neuropathol. (Berl.)* 93 (1997) 129–135.
- [48] H. Wiśniewski, J. Prineas, C.S. Raine, An ultrastructural study of experimental demyelination and remyelination. I. Acute experimental allergic encephalomyelitis in the peripheral nervous system, *Lab. Investig.* 21 (1969) 105–118.
- [49] H. Lassmann, K. Vass, C. Brunner, H.M. Wisniewski, Peripheral nervous system lesions in experimental allergic encephalomyelitis. Ultrastructural distribution of T cells and Ia-antigen, *Acta Neuropathol. (Berl.)* 69 (1986) 193–204.
- [50] L. Giardino, A. Giuliani, M. Fernández, L. Calzà, Spinal motoneurone distress during experimental allergic encephalomyelitis, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 30 (2004) 522–531.
- [51] D. Miljković, I. Spasojević, Multiple sclerosis: molecular mechanisms and therapeutic opportunities, *Antioxid. Redox Signal.* 19 (2013) 2286–2334.

Manuscript Details

Manuscript number	ETP_2017_70
Title	Myotoxic Effects of 3-Nitropropionic Acid on Rat
Article type	Full Length Article
Keywords	skeletal muscle; 3 nitropropionic acid
Taxonomy	Histology, Microscopic Anatomy, Medical Biochemistry, Neuropathology of Toxicants
Corresponding Author	Jose Peña
Corresponding Author's Institution	University of Cordoba
Order of Authors	Eduardo Aguera, Evelio Luque Carabot, Ricardo López-Martos, Ignacio Jimena, Isaac Tunez, Jose Peña

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

Aguera et al_Cover Letter ETP.docx [Cover Letter]

Aguera et al_Author agreement.pdf [Author Agreement]

Aguera et al_Manuscript.docx [Manuscript File]

Aguera et al_Figure Legends.docx [Figure]

Figure 1 - 300 dpi.tif [Figure]

Figure 2 - 300 dpi.tif [Figure]

Figure 3 - 300 dpi.tif [Figure]

Figure 4 - 300 dpi.tif [Figure]

Figure 5 - 300 dpi.tif [Figure]

Figure 6 - 300 dpi.tif [Figure]

Figure 7 - 300 dpi.tif [Figure]

Figure 8 - 300 dpi.tif [Figure]

Figure 9 - 300 dpi.tif [Figure]

Figure 10 - 300 dpi.tif [Figure]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

Dear editor:

Please find enclosed the manuscript "Myotoxic Effects of 3-Nitropropionic Acid on Rat" by Eduardo Agüera et al. to be submitted as original article to *Experimental Toxicologic Pathology*. All co-authors have seen and agree with the contents of the manuscript and there is no financial interest to report. We certify that the submission is original work and is not under review at any other publication.

In this manuscript, we report the results of an experimental study showing the myotoxic effects of 3-nitropropionic acid (3NPA), a well characterized neurotoxin that reproduces a clinical picture similar to Huntington disease.

We believe that our findings could be of interest to the readers of *Experimental Toxicologic Pathology*.

Sincerely yours

José Peña

EDUARDO AGÜERA
EVELIO LUQUE
RICARDO LÓPEZ
IGNACIO JIMENA
ISAAC TÚNEZ
JOSÉ PEÑA

doctoredu@gmail.com
cm1luca@uco.es
ricardo.lopez.martos@gmail.com
cm1jimei@uco.es
fm2tufii@uco.es
cm1peamj@uco.es

To Editor of *Experimental Toxicologic Pathology*

Author Agreement/Declaration

Manuscript: "Myotoxic Effects of 3-Nitropropionic Acid on Rat"

Authors: EDUARDO AGÜERA, EVELIO LUQUE, RICARDO LÓPEZ-MARTOS,
IGNACIO JIMENA, ISAAC TÚNEZ, JOSÉ PEÑA

Undersigned warrant and certify that all authors have seen and approved the final version of the manuscript being submitted and there is no financial interest to report. They warrant that the article is the authors' original work, hasn't received prior publication and isn't under consideration for publication elsewhere.

Signed for and on behalf of the Authors:

Date: February 10, 2017

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'José Peña', is written over a horizontal line. The signature is stylized with loops and a long horizontal stroke extending to the left.

José Peña

Myotoxic Effects of 3-Nitropropionic Acid on Rat

Eduardo Agüera,^{1,4} Evelio Luque,^{2,4} Ricardo López-Martos², Ignacio Jimena^{2,4},
Isaac Túnez^{3,4}, and José Peña^{2,4}

¹ Department of Neurology, Reina Sofia University Hospital, Cordoba, Spain

² Department of Morphological Sciences, Section of Histology, Faculty of Medicine and Nursing. University of Cordoba. Spain

³ Department of Biochemistry and Molecular Biology. Faculty of Medicine and Nursing. University of Córdoba. Spain.

⁴ Maimonides Institute for Biomedical Research IMIBIC, Reina Sofia University Hospital, University of Cordoba. Spain

Corresponding authors: Isaac Túnez and José Peña. Faculty of Medicine and Nursing. University of Córdoba. Av. Menéndez Pidal s/n, 14004 Cordoba. Spain. Phone number: +34 957 218268. Fax: 218246. Emails: fm2tufii@uco.es; cm1peamj@uco.es

Running Title: Myotoxicity of 3-nitropropionic acid

Abstract

We investigated the possible myotoxic effects of 3-nitropropionic acid (3NPA), a well characterized neurotoxin that reproduces a clinical picture similar to Huntington disease. To determine if 3NPA had a myotoxic effect the soleus and extensor digitorum longus (EDL) muscles were studied. The samples were processed for microscopic analysis using histological, histochemical, immunohistochemical and ultrastructural techniques and for biochemical analysis to evaluate oxidative damage and mitochondrial activity. Histological analysis did not show degenerative, regenerative, or neurogenic changes in the muscle fibers. However, oxidative histochemical stains showed an important decrease in succinate dehydrogenase (SDH) activity and focal areas of stain loss with NADH-tr, which was very marked in the soleus muscle and to a lesser extent in the EDL. Ultrastructural analysis revealed very small sized mitochondria compared to normal. The biochemical results did not support the existence of oxidative stress in skeletal muscle, but did show an important decrease of SDH which was significant for the soleus muscle, but not for the EDL. These findings suggest a myotoxic effect of 3NPA on muscle mitochondria, being more important in the soleus muscle than in the EDL. However, the presence of some fibers with cytoarchitectural changes suggests an initial muscular involvement of 3NPA neurotoxicity.

Key words: skeletal muscle; 3 nitropropionic acid; muscle mitochondria; succinate dehydrogenase; oxidative stress

Introduction

Interest in studying the myotoxic effects of different drugs and substances derives not only from their clinical importance but also because many of them are used in experimental models in muscle research (Khan, 1995; Sieb and Gillessen, 2003). 3-nitropropionic acid (3NPA) is a mycotoxin with experimentally proven neurotoxic effects, especially in various regions of the cerebrum such as the striatum (Túnez et al., 2006), and on peripheral nerves (Binienda et al., 2010). This effect has been used to reproduce experimentally the histological, neurochemical and clinical features of Huntington disease (HD) (Schulz and Beal, 1994; Túnez et al., 2006).

Different substances can have both neurotoxic and myotoxic effects (Mitsumori et al., 2004; Kuruppu et al., 2007; de la Monte and Kril, 2014). In fact, the systematic injection of a single dose of 3NPA in Wistar rats is used in experimental models to reproduce the neurological changes of HD (Kumar et al., 2006) and results in a significant decrease of locomotor activity manifest through a decrease in ambulatory movements (Dhir et al., 2008). This suggests that skeletal muscle may be affected by the toxic effect of 3NPA, although this question has been little investigated. Hardly any studies exist aimed at analyzing the possible myotoxic effect of 3NPA; to our knowledge only one study has reported changes in skeletal muscle (Hernández-Echeagaray et al., 2010), although with different results than those obtained by us in the present study, possibly due to different experimental conditions. Therefore, our objective was to determine if in the experimental model used to mimic HD, in addition to the known neurotoxic effect, 3NPA also has a direct myotoxic effect. Given that muscles with different characteristics may respond differently to the effects of toxins, drugs and pharmacologic substances (Westwood et al., 2005; Westwood et al., 2008; Luque et al., 2015, Ozek et al., 2013), we examined the changes in the soleus and extensor digitorum longus (EDL) muscles as they differ in their histochemical and metabolic characteristics (Cornachione et al., 2011).

The results of our study show that 3NPA has myotoxic effects on the mitochondria and sarcoplasmic reticulum of muscle fibers, but not on other structural elements, and provoke an important histochemical and biochemical decrease of SDH. Although it has been reported that oxidative stress plays a relevant role in the

neurotoxicity of 3NPA (Túnez et al., 2010), the results of our study suggest that the myotoxic effect does not appear, at least initially, to be related to oxidative stress.

Material and Methods

Animals

Thirty male Wistar rats weighing approximately 210g were used. Fifteen animals were given 3NPA (in 0.1% DMSO) intraperitoneally (i.p.) at a dose of 20mg/kg for 4 consecutive days. This is the dose used to induce HD symptoms (Kumar et al., 2006). The animals were sacrificed under anesthesia 24 hours following the last injection. Fifteen untreated animals were used as the control. The soleus and EDL muscles of both posterior limbs were excised and prepared for study with light and electron microscopy. These muscles differ between each other in their histochemical, biochemical and functional characteristics as they are composed of very different percentages of fiber types.

All animal welfare standards and animal procedures were in accordance with the Directive of the Council of the European Communities of 24 November 1986 and RD 223/1988, and were adopted by the Directive of 24 November 1986 (86/609 / ECC), and RD 223/1988, and were approved by the Bioethics Committee of the University of Cordoba.

Morphological study

For light microscopy the muscle bellies were frozen in isopentane cooled by liquid nitrogen and a series of transverse sections (8 µm thick) obtained in a cryostat (-20°C). The sections were stained with hematoxylin–eosin, modified Gomori trichrome stain, nicotinamide adenine dinucleotide tetrazolium reductase (NADH-tr), succinate dehydrogenase (SDH), adenosine triphosphatase (ATPase, pH 9.4) and acid phosphatase according to standard methods (Dubowitz and Sewry, 2007). Serial sections were also immunostained with anti-slow (or anti-fast) myosin antibody (1:100, Sigma, Saint Louis, MI, USA) and desmin (1:50, Desmin, DE-R-11, Dako Denmark).

For transmission electron microscopy, the proximal muscle parts were fragmented and fixed in 2.5% glutaraldehyde, postfixed with 1% OsO₄, dehydrated

with acetones and embedded in araldite. Ultrathin sections, stained with uranyl acetate and lead citrate, were examined using a high-resolution transmission electron microscope JEM 1400 (JEOL, USA) (SCAI, University of Córdoba, Spain).

Biochemical study

Determination of lipid peroxidation products. Measurement of malondialdehyde (MDA) + 4-hydroxyalkenals (4-HDA) levels has been used as an indicator of lipid peroxidation and oxidative damage. The levels of lipid peroxides were determined using reagents purchased from Oxis International (LPO-586 kit; Oxis International, Portland, OR, USA). The levels were expressed as nanomoles of MDA+4-HDA per milligram of protein (nmol/mg protein), and absorbance was evaluated in a spectrophotometer (UV-1603, Shimadzu) at a wavelength of 586 nm.

Succinate dehydrogenase activity. SDH activity in the striatum was evaluated by the Strack et al. method (2001). The activity was quantified in a spectrophotometer (UV-1603, Shimadzu) at a wavelength of 600 nm. The values were expressed in units per milligram of protein (U/mg protein).

Protein level quantification. The protein concentration was evaluated by the Lowry method in a spectrophotometer (UV-1603, Shimadzu).

Statistical analysis

The biochemical results of the present study are presented as the mean \pm standard deviation (SD). The analyses were performed using the statistical package SPSS® v.14.0. To calculate statistical significance a one way analysis of variance (ANOVA) was done with a Bonferroni post-hoc test. The differences were considered significant for $p < 0.05$.

Results

Clinical

The rats in the group treated with 3NPA showed some alteration in motor behavior compared with the control group, similar to that described in previous studies (Tasset et al., 2012), data not shown.

Muscular histology, histochemistry and immunohistochemistry

With histological techniques no abnormalities were observed in the soleus and EDL muscles of both the controls and the group treated with 3NPA. The hematoxylin-eosin stain did not show any necrotic, regenerative or inflammatory changes in either muscle (Figure 1). The modified Gomori trichrome staining did not reveal the presence of ragged red fibers, but it did highlight the loss of the granular pattern that is usually observed in normal muscle fibers with this technique (Figure 2).

The histochemical reaction of SDH revealed a decrease in enzymatic activity that was clearly evident in both soleus and EDL muscles (Figure 3). NADH-tr activity was maintained, no increases in subsarcolemmic activity were observed, but some fibers showed irregular intrasarcoplasmic areas devoid of enzymatic activity with core, multicore or moth-eaten appearance (Figure 4). Serial sections stained for myofibrillar ATPase activity did not clearly show these cytoarchitectural changes. No acid phosphatase activity was observed in the muscle fibers (Figure 5).

Immunohistochemical analysis revealed changes in some muscle fibers suggestive of myofibrillar disruption. In this way, with antimyosin, well defined areas of rounded profile without immunoreactivity could be identified within some muscle fiber; also, some muscle fibers showed central accumulation reacting with antidesmin (Figure 6).

Electron microscopy

The main changes detected, that were not seen in the muscles of the controls, were changes in the mitochondria and in the sarcoplasmic reticulum in both muscles. The mitochondrial alterations consisted of an important decrease in their size and a very condensed matrix (Figure 7); many times it could be seen that mitochondria contained electron-dense spherical granules. Proliferation of the cisternae of the sarcoplasmic reticulum was also seen (Figure 8). In general the myofibrillar structure was preserved, although occasionally could be seen in some isolated fibers, small areas with dilated sarcotubular profiles with myofibrillar disorganization or loss of myofilaments (Figure

8). Myonuclei showed a normal appearance and only occasional pyknotic myonuclei were seen. The satellite cells that were observed were quiescent.

Biochemistry

3NPA did not produce significant variations in lipoperoxide levels in both the soleus muscle (0.44 ± 0.10 uM/mg protein in the control group vs. 0.42 ± 0.09 uM/mg protein in the 3NPA group) and the EDL (0.42 ± 0.15 uM/mg protein in the control group vs. 0.37 ± 0.12 uM/mg protein in the 3NPA group) (Figure 9).

SDH did show significant changes in the soleus muscle (4.63 ± 0.20 nmol/mg protein in the control group vs. 2.61 ± 0.15 nmol/mg protein in the 3NPA group) but not for the EDL muscle (3.50 ± 0.69 nmol/mg protein in the control group vs. 3.1 ± 0.59 nmol/mg protein in the 3NPA group) (Figure 10).

Discussion

Toxins are able to produce muscular damage via different mechanisms, causing distinct histological pictures such as necrotizing myopathy, vacuolar myopathy, myofibrillar myopathy and mitochondrial myopathy (Sieb and Gillessen, 2003). In our study, the histochemical, ultrastructural and biochemical analyses indicate that the mitochondria are the target in the myotoxicity of 3NPA. However, unlike other drugs and toxins which produce as morphological expressions the presence of ragged red fibers with important mitochondrial structural abnormalities (Higuchi et al., 1991; Calore et al., 1997; Calore et al., 2000), in our study this type of alteration was not found.

The principal microscopic findings of the present study were the loss of SDH activity in muscle fibers and the reduced mitochondrial size, which was observed in the soleus and EDL muscles. This is consistent with the fact that 3NPA acts as a suicide inhibitor of the SDH enzyme, located in the internal mitochondrial membrane and is responsible for the oxidation of succinate to fumarate (Túnez et al, 2010); the total deficiency of SDH indicates a severe defect in complex II (Sarnat y Marín-García, 2005).

Similarly, although in both muscles there was a biochemical decrease of SDH, this was only significant in the soleus muscle. This suggests that red muscles may be more susceptible to the toxic effects of 3NPA. The explanation must be related to the differing abundance of fiber types and therefore of mitochondrial content: the soleus muscle contains 85-100% slow-twitch fibers, while the EDL contains 95% fast-twitch fibers (Armstrong, 1984). Therefore, a decrease in SDH activity would be less evident in the EDL muscle. Many toxic myopathies preferentially affect the soleus muscle as a consequence of its greater abundance of mitochondria and oxidative enzymes (Khan, 1995; Bodié et al., 2016).

Our results differ with those reported by Hernández-Echegaray et al. (2010), who found an increase in SDH activity in muscle fibers and an increase in the number of mitochondria. According to these authors those changes may be explained by a greater endogenous production of SDH to counteract the inhibition of SDH by 3NPA. In our opinion, this discrepancy can only be explained by differences between the animal species studied, dose used, duration and evolution of the study and muscles analyzed. For example, it is known that a rat is more sensitive to 3NPA treatment than a mouse (Túnez et al., 2010). Additionally, they used different doses in species with a different metabolism rate; 15mg/kg 3NPA compared with a dose of 20mg/kg used in our study and which is the dose confirmed as that required to reproduce the neurotoxic effects in the HD experimental model (Kumar et al., 2006).

Our ultrastructural analysis showed that in addition to the mitochondria, 3NPA affected the sarcoplasmic reticulum. The proliferation and vesiculation of the sarcoplasmic reticulum may explain the presence of the irregular areas of NADH-tr histochemical activity; in addition to in the mitochondria, this enzyme is located in the sarcoplasmic reticulum (Carpenter and Karpati, 2001). Although in some toxic myopathies the alteration of the organelles such as the mitochondria and sarcoplasmic reticulum appear to be implicated in processes of autophagy (Khan 1995), in our study this was not observed as was demonstrated by the absence of the histochemical activity of acid phosphatase and absence of autophagic bodies seen with electron microscopy. This indicates that in our study, the mitochondria had suffered an important decrease in size but were not eliminated. When mitochondria degenerates microscopic evidence of autophagy appears (Watts et al., 2004; Luque et al., 2015).

Interestingly, in our study, biochemical data indicate absence of oxidative stress in skeletal muscle, whereas in the same model we have previously shown that 3NPA did provoke oxidative stress in the CNS promoting neuronal degeneration in the striate nucleus (Túnez et al., 2006). In our opinion, our ultrastructural observations appear to indicate that the toxic effect of 3NPA at muscle level would not be linked to oxidative stress. In this regard, it has been pointed out that oxidative damage to mitochondria and / or mitochondrial proteins may represent the main initial pathway of damage induced by free radicals within skeletal muscle (Haycock et al., 1996). These authors reported that mitochondria showed a pattern of swelling and vacuolation of their ridges that we did not find in our study. On the other hand, as degenerative and inflammatory changes in skeletal muscle increase oxidative stress (Jimena et al., 2008; Kim et al., 2013), the absence of this in our case could also argue in favor that the route of action of 3NPA would be found to be associated with the alteration of energy production in both the Krebs cycle and the electron transport chain, with the involvement of oxidative damage probably being a longer term effect than this mitochondrial-energy situation. We can also not exclude a lower sensitivity of muscle mitochondria to 3NPA compared to neuronal ones; the differences we found between the two muscles studied could support this.

Muscle fibers in denervating conditions may show marked disruption of myofibrillar organization (Carpenter and Karpati, 2001). In our study, the occasional observation in electron microscopy of some myofibrils with some degree of disorganization or dissolution together with muscle fibers with cytoarchitectural changes (core, multicore, moth-eaten) in light microscopy, suggest an initial neurogenic lesion (Luque et al., 2015). This damage may be an indirect consequence of the neurotoxicity of 3NPA; Echegaray et al (2010) have reported that muscles treated with 3NPA exhibited disorganization of the sarcomeres. However, we can not exclude that in a chronic treatment, could occur a significant myofibrillar disorganization, because have shown that chronic exposure to 3NPA leads to axonal degeneration in the peripheral nerve (Binienda et al., 2010).

Conclusion

In conclusion, the pathological changes in our study suggest that 3NPA appears to have a direct myotoxic effect on mitochondria. The structural changes in muscle mitochondria and the decreased SDH enzymatic activity may alter or deplete the mitochondrial capacity to generate energy and may be responsible for the alteration in locomotor activity. Although some changes suggestive of neurogenic injury in skeletal muscle were observed in our study, presumably a chronic treatment may cause more severe neurogenic changes in skeletal muscle, indicative of indirect damage due to the involvement of the nervous system.

References

- Armstrong, R.B., Phelps, R.O., 1984. Muscle fiber type composition of the rat hindlimb, *Am. J. Anat.* 171, 259-72.
- Binienda, Z.K., Beaudoin, M.A., Gough, B., Ali, S.F., Virmani, A., 2010. Assessment of 3-nitropropionic acid-evoked peripheral neuropathy in rats: Neuroprotective effects of acetyl-L-carnitine and resveratrol. *Neurosci. Lett.* 480, 117-21.
- Bodié, K., Buckb, W.R., Pieha, J., Liguorib, M.J., Poppa A., 2016. Biomarker evaluation of skeletal muscle toxicity following clofibrate administration in rats. *Exp. Toxicol Pathol* 68, 289–299.
- Calore, E.E., Cavaliere, M.J., Haraguchi, M., Górniak, S..L., Dagli, M.L.Z., Raspantini, P.C., Perez Calore, N.M., 1997. Experimental mitochondrial myopathy induced by chronic intoxication by *Senna occidentals* seeds. *J. Neurol. Sci.* 146, 1-6.
- Calore, E.E., Weg, R., Haraguchi, M., Calore, N.M.P., Cavaliere, M.J., Sesso A., 2000. Mitochondrial metabolism impairment in muscle fibres of rats chronically intoxicated with *Senna occidentalis* seeds. *Exp. Toxic. Pathol.* 52, 357-363.
- Carpenter, S., Karpati, G., 2001. *Pathology of Skeletal Muscle*, Oxford University Press, New York. pp. 3-7.
- Cornachione, A.S., Cação-Benedini, L. O., Polizello, J.C., Carvalho, L.C., Mattiello-Sverzut, A.C., 2011. Characterization of fiber types in different muscles of the hindlimb in female weanling and adult Wistar rats. *Acta Histochem. Cytochem.* 44, 43–50.
- de la Monte, S.M., Kril, J.J., 2014. Human alcohol-related neuropathology *Acta Neuropathol.* 127, 71–90.
- Dhir, A., Akula, K.K., Kulkarni, S.K., 2008. Tiagabine, a GABA uptake inhibitor, attenuates 3-nitropropionic acid-induced alterations in various behavioral and biochemical parameters in rats. *Prog. Neuro-Psychoph.* 32, 835-43.

- Dubowitz, V., Sewry C.A., 2007. Muscle Biopsy: A Practical Approach, third ed., Saunders Elsevier, London. pp. 28-39
- Haycock, J.W., Jones, P., Harris, J.B., Mantle, D., 1996. Differential susceptibility of human skeletal muscle proteins to free radical induced oxidative damage: a histochemical, immunocytochemical and electron microscopical study in vitro. *Acta Neuropathol.* 92, 331-40.
- Hernández-Echeagaray, E., González, N., Ruelas, A., Mendoza, E., Rodríguez Martínez, E., Antuna-Bizarro R., 2011. Low doses of 3-nitropropionic acid in vivo induce damage in mouse skeletal muscle. *Neurol. Sci.* 32, 241-54.
- Higuchi, I., Takahashi, K., Nakahara, K., Izumo, S., Nakagawa, M., Osame M., 1991. Experimental germanium myopathy. *Acta Neuropathol.* 82, 55-9.
- Jimena, I., Tasset, I., López-Martos, R., Rubio, A.J., Luque, E., Montilla, P., Peña, J., Túnez, I., 2009. Effects of magnetic stimulation on oxidative stress and skeletal muscle regeneration induced by mepivacaine in rat. *Med. Chem.* 5, 44-9.
- Kim, J.H., Kwak, H.B., Thompson, L.D., Lawler, J.M., 2013. Contribution of oxidative stress to pathology in diaphragm and limb muscles with Duchenne muscular dystrophy. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 34, 1-13.
- Khan, M.A., 1995. Effects of myotoxins on skeletal muscle fibers. *Prog. Neurobiol.* 46, 541-60.
- Kumar, P., Padi, S.S., Naidu, P.S., Kumar, A., 2006. Effect of resveratrol on 3-nitropropionic acid-induced biochemical and behavioural changes: possible neuroprotective mechanisms. *Behav. Pharmacol.* 17, 485-92.
- Kuruppu, S., Robinson, S., Hodgson, W.C., Fry, B.G., 2007. The in vitro neurotoxic and myotoxic effects of the venom from the *Suta* genus (curl snakes) of elapid snakes. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 101, 407-410.
- Luque, E., Ruz-Caracuel, I., Medina, F.J., Leiva-Cepas, F., Agüera, E., Sánchez-López, F., Lillo, R., Aguilar-Luque, M., Jimena, I., Tunez, I., Peña, J., 2015. Skeletal muscle findings in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Pathol. Res. Pract.* 211, 493-504.
- Mitsumori, K., Moto, M., Imazawa, T., 2004. Ultrastructural morphology of motor endplate neurotoxicities in rats. *J Toxicol. Pathol.* 17, 85-94.
- Ozek, N.S., Burak Bal I., Sara, Y., Onur, R., Severcan, T., 2014. Structural and functional characterization of simvastatin-induced myotoxicity in different skeletal muscles. *BBA-Gen Subjects* 1840, 406-15.
- Sarnat, H.B., Marín-García J., 2005. Pathology of mitochondrial encephalomyopathies. *Can. J. Neurol. Sci.* 32, 152-66.

- Schulz, J.B., Beal, M.F., 1994. Mitochondrial dysfunction in movement-disorders. *Curr. Opin. Neurol.* 7, 333-39.
- Sieb, J.P., Gillessen, T., 2003. Iatrogenic and toxic myopathies. *Muscle Nerve* 27, 142-56.
- Strack, A., Duffy, C.F., Malvey, M., Arriaga, E.A., 2001. Individual mitochondrion characterization: a comparison of classical assays to capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Anal. Biochem.* 294, 141-47.
- Tasset, I., Medina, F.J., Jimena, I., Agüera, E., Gascón, F., Feijóo, M., Sánchez-López, F., Luque, E., Peña, J., Drucker-Colín, R., Túnez, I., 2012. Neuroprotective effects of extremely low-frequency electromagnetic fields on a Huntington's disease rat model: effects on neurotrophic factors and neuronal density. *Neuroscience* 209, 54-63.
- Túnez, I., Drucker-Colin, R., Jimena, I., Medina, F.J, Muñoz, M.C., Peña, J., Montilla P., 2006. Transcranial magnetic stimulation attenuates cell loss and oxidative damage in the striatum induced in the 3-nitropropionic model of Huntington's disease. *J. Neurochem.* 97, 619-30.
- Túnez, I., Tasset, I., Pérez-De la Cruz, V., ,Santamaría, A., 2010. 3-nitropropionic acid as a tool to study the mechanisms involved in Huntington's disease: past, present and future. *Molecules* 15, 878-916.
- Watts, J.A., Kline, J.A., Thornton, L.R., Grattan, R.M., Brar S.S., 2004. Metabolic dysfunction and depletion mitochondria in hearts of septic rats. *J. Mol. Cell Cardiol.* 36, 141-50.
- Westwood, F. R., Bigley, A., Randall, K., Marsden, A. M., Scott, R. C., 2005. Statin-induced muscle necrosis in the rat: distribution, development, and fibre selectivity. *Toxicol. Pathol.* 33, 246-57.
- Westwood, F.R., Scott, R. C, Marsden, A. M., Bigley, A., Randall, K., 2008. Rosuvastatin: characterization of induced myopathy in the rat. *Toxicol. Pathol.* 36, 345-52.

Figure legends

Fig. 1. Cross- sections of soleus (a) and EDL (b) muscles of the control group. No changes were observed in the soleus (c) and EDL (d) muscles of the 3NPA treated group. Hematoxylin-eosin. Original objective 20x

Fig. 2. Cross-sections of soleus (a) and EDL (b) muscles of the control group. Muscle fibers containing fine reddish granules, not evident in the soleus (c) and EDL (d) muscles of the 3NPA treated group. Modified Gomori trichrome. Original objective 40x

Fig.3. Cross-sections of soleus (a) and EDL (b) muscles of the control group. In the 3NPA group, neither the muscle fibers of the soleus (c) nor the muscle fibers of EDL (d) showed activity for SDH. Original objective 40x

Fig. 4. Cross-sections of soleus (a) and EDL (b) muscles of the control group. In the 3NPA treated group, the muscle fibers of the soleus have central and irregular areas of loss of enzymatic activity similar to core (arrows) and moth eaten (arrowhead) fibres (c); core (arrow) and moth eaten fiber (arrowhead) is shown as areas devoid of staining in the EDL muscle (d). NADH-tr. Original objective 40x

Fig.5. Cross-sections of soleus (a) and EDL (b) muscles of the control group, in which no acid phosphatase activity is observed. In the group treated with 3NPA, there is also no activity for this enzyme in muscle fibers except for an isolated necrotic fiber (arrow) in soleus muscle (c) and in a small marginal area (arrow) of a muscle fiber in the EDL muscle. Acid phosphatase. Original objective 40x

Fig.6. Cross-sections of EDL (a) and soleus (b) corresponding to rats of the 3NPA treated group. (a) Arrows indicate two muscle fibers with core-like lesions showing an increased immunolabeling of desmin (arrows). (b) Immunofluorescence microscopy of slow myosin showing two muscle fibers with core-like lesions showing a decreased immunolabeling (arrows). Original objective 40x

Fig. 7. Cross-section electron micrographs of soleus muscle fiber of the control (a) and 3NPA (b) treated groups. Compare between the two images the morphology and size of the mitochondria (arrows), arranged between myofibrils. In *b*, mitochondria, with flattened morphology, are very small and have a dense matrix.

Fig.8. Cross-section electron micrographs of EDL (a) and soleus (b, d) muscle fibers of 3NPA treated groups. In all three images the mitochondria can not be identified practically and are occupied by electron dense grains; surrounding the myofibrils can be observed accumulations of numerous membranous profiles resulting from sarcoplasmic reticulum dilation (arrowhead). Myofibrils may be well preserved, with loss of myofilaments (asterisks) (b) or in disintegration (c). The image *c* could correspond to a core-like zone.

Fig. 9. Changes in the levels of lipid peroxidation products in EDL and soleus (SOL) muscles. It is shown that the lipoperoxides do not change significantly in the muscles treated with 3NPA compared to the control muscles. Values are means \pm SD.

Fig. 10. Changes in the succinate dehydrogenase activity in EDL and soleus (SOL) muscles. It is shown that, although there was a decrease of SDH activity in both muscles treated with 3NPA, this was only significant for the SOL muscles treated with 3NPA. *Significantly different from the control SOL muscles, p value < 0.05 ns \pm SD. Values are means \pm SD.

